

Ravintotekijöiden vaikutus β -kateniinin aminohappotähteiden fosforylaatioon paksusuolisyyöpämalleissa

Pro gradu -tutkielma

Heli Diaz
Ravitsemustieteen osasto
Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos
Helsingin yliopisto
Maaliskuu 2014

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution– Department	
Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author			
Heli Diaz			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
Ravintotekijöiden vaikutus β -kateeniinin aminohappotähteiden fosforylaatioon paksusuolisyöpämalleissa			
Oppiaine /Läroämne – Subject			
Ravitsemustiede			
Työn laji/Arbetets art – Level		Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages
Pro gradu -tutkielma		Maaliskuu 2014	82 + liitteet
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>Johdanto: β-kateeniini on proteiini, joka toimii osana solun kasvua edistävää Wnt-reittiä. β-kateeniinin säätelyjärjestelmän häiriintyminen edistää esisyöpägeenien eli proto-onkogeenien ilmentymistä, mikä johtaa solujen hallitsemattomaan jakautumiseen ja suolistosyvän kehittymiseen. β-kateeniinia säädellään solussa sen hajottamisen ja fosforylaation avulla. β-kateeniinin fosforyloitumisen seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä on osoitettu lisäävän proto-onkogeenien ilmentymistä, ja sitä kautta edistävän suolistosyvän kehittymistä. Toistaiseksi on vain yksittäisiä julkaisuja siitä, miten ravinto vaikuttaa β-kateeniinin fosforyloitumiseen suoliston limakalvolla.</p> <p>Tavoitteet: Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää fluoresenssiin perustuvaa Western blotting –menetelmää erilaisten β-kateeniinin fosforylaatiomuotojen määrittämiseksi paksusuolisyöpämallien kudosa- ja solunäytteistä. Optimoitua menetelmää käytettiin mittaamaan fosfo-Ser552- ja fosfo-Ser675-β-kateeniinipitoisuudet näytteistä, jotka olivat peräisin kahdesta osastolla aiemmin Apc^{Min}-hiirillä tehdystä dieettitutkimuksesta. Tavoitteena oli nähdä, vaikuttavatko tutkimusdieetit fosfo-β-kateeniinin määrään hiirien suoliston limakalvossa ja ovatko fosfo-β-kateeniinipitoisuudet yhteydessä suolistokasvaimien muodostumiseen.</p> <p>Aineisto- ja menetelmät: Tutkimuksessa hyödynnettiin aikaisemmista tutkimuksista peräisin olevia ihmisen paksusuolisyövän solunäytteitä ja paksusuolisyövän eläinmallin, Apc^{Min}-hiiren suoliston limakalvonäytteitä. Näitä näytteitä käytettiin kehittämään fluoresenssiin pohjautuvaa menetelmää β-kateeniinin eri fosforylaatiomuotojen (Ser33/37/Thr41, Thr41/Ser45, Ser552, Ser675 ja Tyr654) mittaamiseksi saatavilla olevilla kaupallisilla vasta-aineilla. Kehitetyllä menetelmällä analysoitiin kokonais-, fosfo-Ser552- ja fosfo-Ser675-β-kateeniinipitoisuudet kahdesta Apc^{Min}-hiirillä tehdystä tutkimuksesta, joissa toisessa oli tutkittu kasvistanolin ja toisessa ns. länsimaaisen, paljon rasvaa, vähän kalsiumia ja D₃-vitamiinia sisältävän dieetin vaikutusta suolistokasvaimien muodostumiseen. Tulokset analysoitiin PASW Statistics 18.0 – ohjelmalla käyttämällä Mann-Whitney U -testiä ja Spearmanin järjestyskorrelaatiota.</p> <p>Tulokset: Fluoresenssiin pohjautuva menetelmä toimi määrittäessä fosfo-Ser552- ja fosfo-Ser675-β-kateeniinia solu- ja hiirinäytteistä sekä fosfo-Ser33/37/Thr41-β-kateeniinia solunäytteistä. Olosuhteita ei saatu optimoitua fluoresenssiin pohjautuvalle menetelmälle soveltuvaksi analysoitaessa fosfo-Tyr654- ja fosfo-Thr41/Ser45-β-kateeniinia solu- ja hiirinäytteistä sekä fosfo-Ser33/37/Thr41-β-kateeniinia hiirinäytteistä. Perinteisellä kemiluminesenssiin perustuvalla menetelmällä saatiin signaali fosfo-Thr41/Ser45-β-kateeniinista solunäytteistä, mutta ei hiirinäytteistä.</p> <p>Kasvistanolidieettiä saaneilla hiirillä oli tilastollisesti merkitsevästi enemmän suolistokasvaimia verrattuna kontrollihiiriin (p=0,002). Kasvistanolidieettiryhmällä oli tilastollisesti merkitsevästi enemmän β-kateeniinia (p=0,043) ja fosfo-Ser675-β-kateeniinia (p=0,027) kuin kontrolliryhmällä. Fosfo-Ser552-β-kateeniini noudatti samaa trendiä kuin fosfo-Ser675-β-kateeniini, mutta ryhmien välinen ero ei aivan saavuttanut tilastollista merkitsevyyttä (p=0,077). Länsimaista dieettiä saaneille hiirille muodostui tilastollisesti merkitsevästi enemmän suolistokasvaimia kuin kontrollihiirille (p=0,002). Länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä oli systemaattisesti enemmän β-kateeniinia ja sen fosforyloituneita muotoja (Ser552 ja Ser675) kuin kontrollihiirillä, mutta erot eivät saavuttaneet tilastollista merkitsevyyttä (p=0,165, p=0,198, p=0,440).</p> <p>Johtopäätökset: Uusi, fluoresenssiin perustuva menetelmä soveltuu paremmin β-kateeniinin fosforylaatiomuotojen määrittämiseen kuin perinteinen, kemiluminesenssiin pohjautuva menetelmä, sillä fluoresenssiin perustuvalla menetelmällä voidaan analysoida samanaikaisesti sekä β-kateeniinin fosforylaatiomuotoa että kokonais-β-kateeniinia toisin kuin perinteisellä kemiluminesenssiin pohjautuvalla menetelmällä. Tulosten perusteella ravinnolla voidaan vaikuttaa β-kateeniinin fosforylaatioon. Erityisesti kasvistanolit lisäsivät β-kateeniinin fosforyloitumista sekä seriini675-aminohappotähteestä että vähäisemmässä määrin seriini552-aminohappotähteestä. β-kateeniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä todennäköisesti ehkäisi β-kateeniinin hajottamista, mikä on voinut lisätä sen määrää sytosolissa. β-kateeniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä saattoi edistää vapaana sytosolissa olevan β-kateeniinin siirtymistä tumaan. Tumassa β-kateeniini on ilmeisesti osallistunut kiihtyneeseen suolistokasvaimien muodostumiseen lisäämällä proto-onkogeenien ilmentymistä.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
β -kateeniini, fosforylaatio, Ser675, Ser552, suolistosyöpä			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Ravitsemustieteen osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			
Ohjaaja: dosentti, yliopistonlehtori Anne-Maria Pajari			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution– Department	
Faculty of agriculture and forestry		Department of food and environmental science	
Tekijä/Författare – Author			
Heli Diaz			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
The effect of dietary components on phosphorylation of β -catenin in colon cancer models			
Oppiaine /Läroämne – Subject			
Nutrition science			
Työn laji/Arbetets art – Level		Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages
Master's thesis		March 2014	82 + annexes
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p><i>Background</i></p> <p>Protein called β-catenin has the key role in the Wnt signaling pathway which induces cell division and growth. The disruption of the β-catenin degradation can lead to uncontrolled cell division and development of colon cancer due to β-catenin's ability to enhance the expression of the proto-oncogenes in Wnt signaling pathway. Cells control β-catenin by degradation and phosphorylation. Phosphorylated β-catenin at serine675 and serine552 residues increases proto-oncogene expression, and thereby promotes colon cancer formation. At present, only few research articles have addressed whether diet can affect the phosphorylation status of β-catenin in the intestinal mucosa.</p> <p><i>Objective</i></p> <p>The objective of the master's thesis was to develop fluorescence-based western blotting method to analyze phosphorylated β-catenin forms from colon cancer cell and intestinal mucosa tissue samples. Optimized method was used to analyze phospho-Ser675- and phospho-Ser552-β-catenin from samples derived from two dietary studies conducted with Apc^{Min} mice. The aim of this was to determine whether dietary components have effect on phosphorylation of β-catenin in the intestinal mucosa tissue and whether phosphorylated β-catenin correlated with intestinal adenoma number and size.</p> <p><i>Materials and methods</i></p> <p>Fluorescence-based western blotting method was developed to analyze all the β-catenin phosphorylation forms that can be detected by using commercially available antibodies (Ser33/37/Thr41, Thr41/Ser45, Ser552, Ser675 and Tyr654). Phospho-β-catenin was measured from samples obtained from colon cancer cells lines and intestinal mucosa tissue of Apc^{Min} mice (a model of colon cancer). Optimized method was used to analyze β-catenin, phospho-Ser675- and phospho-Ser552-β-catenin levels from normal intestinal mucosa samples of Apc^{Min} mice originated from two dietary studies. In the first study mice were fed 0,8 % plant stanol diet and in the second study mice were fed western type diet which contained high levels of fat and saturated fat and low levels of calcium and vitamin D₃. The aim of the two studies was to determine whether plant stanol and western type diet have effect on tumor formation. Statistical analyses were made by using Mann-Whitney U test and Spearman correlation (PASW Statistics 18.0 software).</p> <p><i>Results</i></p> <p>By using fluorescence-based western blotting method phospho-Ser675- and phospho-Ser552-β-catenin were detected in cell and mouse samples as well as phospho-Ser33/37/Thr41-β-catenin in cell samples. The method could not be optimized for the detection of phospho-Tyr654- and phospho-Thr41/Ser45-β-catenin in cell and mouse samples and phospho-Ser33/37/Thr41-β-catenin in mouse samples. However, phospho-Thr41/Ser45-β-catenin was detected in cell samples but not in mouse samples by using the chemiluminescence-based western blotting method.</p> <p>The adenoma number was significantly higher in mice fed plant stanol diet than in control mice (p=0,002). Plant stanol diet resulted in significantly higher levels of β-catenin (p=0,043) and phospho-Ser675-β-catenin (p=0,027) compared with control diet. Although, phospho-Ser552-β-catenin followed the same trend as phospho-Ser675-β-catenin, the levels of phospho-Ser552-β-catenin did not reach statistical significance between plant stanol and control group (p=0,077). Mice consumed western type diet had significantly higher number of adenomas than control mice (p=0,002). The levels of β-catenin and phosphorylated β-catenin (Ser552 and Ser675) were consistently higher in western type diet mice than control mice but there were no significant differences between the groups (p=0,165, p=0,198, p=0,440).</p> <p><i>Conclusions</i></p> <p>Fluorescence-based western blotting method is more reliable for analyzing β-catenin phosphorylation forms than chemiluminescence-based western blotting method: unlike chemiluminescence-based western blotting method, fluorescence-based western blotting method can allow the detection β-catenin and phospho-β-catenin at the same time. Based on results, diet can affect β-catenin phosphorylation. Especially plant stanol diet increased β-catenin fosforylation at residues serine675 as well as serine552 but less significantly in the intestinal mucosa. Phosphorylation of serine675 residue inhibits β-catenin degradation which seems to have increased the cytosolic level of β-catenin. Phosphorylation of serine552 residue has probably induced β-catenin to translocate from the cytoplasm to the nucleus. Inside the nucleus β-catenin may have promoted tumor formation by increasing the expression of proto-oncogenes.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
β -catenin, phosphorylation, Ser675, Ser552, colon cancer			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Nutrition division			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			
Supervisor: adjunct professor, university lecturer Anne-Maria Pajari			

Alkusanat

Haluan kiittää Anne-Maria Pajaria kokonaisvaltaisesta ja perusteellisesta ohjauksesta. Omistautumisesi ravinnon ja paksusuolisyövän välisen yhteyden tutkimiselle on innostanut minua oppimaan lisää. Kiitos Essi Päivärinta, Anu Heiman-Lindh ja Maija Marttinen avuliaasta ohjauksesta laboratoriossa, te olette piristäneet päiviäni laboratoriossa. Haluan kiittää myös ystävääni Jemina Kivelää ja siskoani Henna Luoma-Halkolaa, jotka ovat jaksaneet kannustaa minua gradun teossa ja antaa parannusehdotuksia tähän työhön. Kiitos kuuluu myös Suvi Itkoselle, jonka kanssa olen saanut jakaa yhteisen tutkijahuoneen. Kiitos ystävilleni, olette kuunnelleet ja tukeneet minua gradun teon aikana. Lopuksi haluan kiittää miestäni, Jose Martin Ramos Diazia, joka on kannustanut minua gradun kirjoittamisessa ja tuonut elämänilollaan valoa arkeeni.

Heli Diaz

Helsingissä 28.2.2014

Lyhennelistä	1
1 Johdanto	3
2 Kirjallisuuskatsaus	5
2.1 β -kateniinin rakenne ja tehtävät.....	5
2.1.1 β -kateniini soluliitosten ja solun tukirangan osana.....	5
2.1.2 β -kateniini Wnt-reitin geenien ilmentymisen edistäjänä	6
2.1.3 β -kateniini solusyklin säätelijänä.....	10
2.2 β -kateniini ja sen erilaiset fosforylaatiomuodot	11
2.2.1 Tyrosiinitähteiden fosforylaatio	12
2.2.2 Treoniinitähteiden fosforylaatio	13
2.2.3 Seriinitähteiden fosforylaatio	14
2.2.4 N-terminaalisen pään fosforylaatio	19
2.3 β -kateniini paksusuolisyövässä.....	21
2.3.1 β -kateniinin fosforylaatio paksusuolisyövän kehittämisessä	25
2.3.1.1 Fosfo- β -kateniinin merkitys Wnt-reitissä.....	26
2.3.1.2 Fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniini solusyklin säätelijänä	27
2.3.1.3 Signaalireitit β -kateniinin fosforylaation säätelijänä.....	27
2.3.1.4 Ravinnon vaikutus β -kateniinin fosforylaatioon	28
3 Pro gradu -tutkielman tavoite	32
4 Tutkimusmenetelmät ja aineistot	33
4.1 Western blotting –menetelmä.....	33
4.2 Fosfo- β -kateniinin määrittäminen Western blotting -menetelmällä.....	34
4.3 Aineistot.....	40
4.3.1 Kasvistanolidieettitutkimuksen asetelma	41
4.3.2 Länsimainen dieetti -tutkimuksen asetelma	41
4.3.3 Hiirien lopetus ja näytteiden käsittely Western blotting –menetelmää varten	42
4.4 Tilastolliset menetelmät.....	42
5 Tulokset.....	43
5.1 Western blotting –menetelmän optimointi β -kateniinin fosforylaatiomuodoille	43
5.2 Kasvistanolitutkimus	45
5.2.1 Kasvistanolien vaikutus suolen limakalvon β -kateniiniin	45
5.2.2 β -kateniinin yhteys suolistokasvaimien kehittymiseen kasvistanolitutkimuksessa.....	46
5.2.3 β -kateniini ja muut signaalireitit kuin Wnt-reitti kasvistanolitutkimuksessa	46
5.3 Länsimainen dieetti -tutkimus	48
5.3.1 Länsimaisen dieetin vaikutus suolen limakalvon β -kateniiniin.....	48
5.3.2 β -kateniini yhteys suolistokasvaimien kehittymiseen länsimainen dieetti -tutkimuksessa.....	49
5.3.3 β -kateniini ja muut signaalireitit kuin Wnt-reitti länsimainen dieetti -tutkimuksessa.....	51
6 Tulosten pohdinta.....	53

6.1 Western blotting –menetelmän optimointi fosfo- β -kateniinille	53
6.2 Kasvistanolien vaikutus suolistokasvaimien muodostumiseen ja β -kateniinin fosforylaatioon	55
6.2.1 Kasvistanolien vaikutus suolistokasvaimiin	55
6.2.2 Kasvistanolien vaikutus β -kateniiniin ja sen fosforylaatioon	55
6.2.3 Fosfo- β -kateniinipitoisuuksien yhteys kasvaimien lukumäärään ja kokoon kasvistanolitutkimuksen hiirillä	58
6.2.4 Wnt-reitin ja muiden signaalireittien vuorovaikutus kasvistanolidieettiä saaneilla hiirillä	59
6.2.4.1 Wnt- ja EGFR-reitti	59
6.2.4.2 Wnt- ja Akt-reitti	60
6.2.4.3 Yhteenveto Wnt-reitin kanssa vuorovaikutuksessa olevista signaalireiteistä kasvistanolidieettiä saaneilla hiirillä	61
6.3 Länsimaisen dieetin vaikutus suolistokasvaimien muodostumiseen ja β -kateniinin fosforylaatioon	62
6.3.1 Länsimaisen dieetin vaikutus β -kateniiniin ja sen fosforylaatioon	62
6.3.2 Fosfo- β -kateniinipitoisuuksien yhteys kasvaimien lukumäärään ja kokoon länsimainen dieetti –tutkimuksen hiirillä	63
6.3.3 Länsimaisen dieetin osatekijöiden vaikutus β -kateniiniin	65
6.3.4 Wnt-reitti ja insuliiniresistenssi	69
6.3.5 Yhteenveto länsimainen dieetti -tutkimuksesta	71
7. Yhteenveto	72
Kirjallisuusluettelo	74
Liitteet	83

Lyhennelista

AOM	azoxymethane
APC	adenomatous polyposis coli
Bt ₂ cAMP	dibutyryyli-syklinen adenosiinimonofosfaatti
CBP	CREB-sitojaproteiini
CHO cell	chinese hamster ovary cell
CK1 α	kaseiinikinaasi 1 α
CK2	kaseiinikinaasi 2
CSCs	paksusuolisyövän kantasolut
DNA	deoksiribonukleiinihappo
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
EPA-FFA	vapaa eikosapentaeenihappo
ERK	extracellular-signal-regulated kinases
FAP	familial adenomatous polyposis
GSK3	glykokeenisyntaasikinaasi 3
HEK293 cell	human embryonic kidney 293 cell
HGF	hepatosyyttikasvutekijä
LDL	low density lipoprotein
LEF	lymphocyte enhancer factor
LRP5/6	LDL receptor-related proteins 5/6
MET	mesenchymal-to-epithelial transition
MFCM	myofibroblasti
MUFA	kertatyydyttymättömät rasvahapot
n-6 PUFA	monityydyttymättömät n-6-rasvahapot
PAK1	P21 protein -activated kinase 1
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Proteiinikinaasi A
PKAc	Proteiinikinaasi A:n katalyyttinen alayksikkö
PMSF	fenyyylimetyylisulfonyyli fluoridi
PP2A	proteiinifosfataasi 2A
PUFA	monityydyttymättömät rasvahapot

PVDF	polyvinyyliideenifluoridi
SDS	natriumlauryylisulfaatti
SDS-PAGE-geeli	natriumlauryylisulfaatti-polyakryyligeeli
Ser	seriini
SFA	tyydyttymättömät rasvahapot
TBP	TATA-sitojaproteiini
TBS	Tris-buffered saline
TCF	T cell factor
TLE	transducin-like enhancer of split
Thr	treoniini
Tyr	tyrosiini
Wnt	Wingless Int-1
Wnt3a	Wingless 3a
Wnt5a	Wingless 5a
α -kateniini	alfa-kateniini
β -kateniini	beta-kateniini
β -TrCP	beta-transducin repeat-containing protein

1 Johdanto

Paksusuolisyöpä on kolmanneksi yleisin syöpätyyppi Suomessa ja maailmalla (Sankila & Pukkala 2009, WCRFI 2013). Paksusuolisyöpä koskettaakin merkittävää osaa ihmisistä, sillä jopa puolelle länsimaisista ihmisistä muodostuu polyyppeja eli paksusuolisyövän esiasteita 70 vuoden ikään mennessä (ks. Radtke & Clevers 2005). Maailmanlaajuisesti 1,24 miljoonalla ihmisellä diagnosoitiin paksusuolisyöpä vuonna 2008 (WCRFI 2013). Suomessa 1620 ihmisellä diagnosoitiin paksusuolisyöpä ja paksusuolisyöpään kuoli 685 ihmistä vuosien 2006–2010 välisenä aikana (Nordcan 2013). Paksusuolisyöpä yleistyy tulevaisuudessa etenkin pieni- ja keskituloisissa maissa, mikä asettaa taloudellisia haasteita, sillä paksusuolisyövän hoitaminen on kallista (IARC 2008a). Paksusuolisyövän ehkäisyyn ja seulontaan tulisi panostaa, koska ne ovat kustannustehokkaampia vaihtoehtoja kuin paksusuolisyövän hoito (IARC 2008b).

Anand ym. (2008) arvioi, että elintavat kuten ravitsemus ja ympäristö vaikuttavat syövän etiologiaan 90–95 %:ssa syöpätapauksista, kun taas ainoastaan 5-10 % syöivistä on perinnöllisiä. Paksusuolisyöpä ei ole tästä poikkeus. Maailman syöpäsäätiön raportin (WCRF 2007) mukaan ravinto voi vaikuttaa erityisesti paksusuolisyövän riskiin, sillä paksusuoli on jatkuvassa vuorovaikutuksessa ruoan komponenttien, niiden aineenvaihduntatuotteiden ja säätelytekijöiden kuten hormonien kanssa.

Ravintotekijöiden vaikutukset paksusuolisyövän etiologiaan on tärkeää ymmärtää, jotta paksusuolisyövän ennaltaehkäisyä ja hoitoa voidaan kohdentaa ja kehittää. Ravintotekijöiden yhteyttä paksusuolisyöpään on tutkittu etenkin suolistosyövän eläinmalleilla kuten *Apc^{Min}*-hiirillä, joissa paksusuolisyövän *APC*-tuumorisuppressorigeenin (engl. Adenomatous Polyposis Coli) mutaatio johtaa suolistosyövän esiasteeseen (Kinzler ja Vogelstein 1996). Ravintotekijöiden ja suolistosyövän yhteyden tutkiminen näillä malleilla on mielekästä, koska *APC*-tuumorisuppressorigeenin mutaatiota esiintyy 80 %:lla sporadista paksusuolisyöpää sairastavilla (ks. Lustig & Behrens 2003). Sporadisessa paksusuolisyövässä elintapojen ja ympäristön vaikutus syövän kehittymiseen korostuu, sillä siihen ei liity vahvaa perinnöllistä taipumusta.

APC-geenin mutaatio johtaa β -kateniini-nimisen proteiinin hajottamisen häiriintymiseen (Clevers ym. 2006). Tämän seurauksena β -kateniinia kerääntyy soluun, mikä mahdollistaa β -kateniinin siirtymisen tumaan lisäämään proto-onkogeenien eli esisyöpägeenien ilmentymistä (ks. Vries ym. 2010). Suolistossa liiallinen β -kateniinin kohdegeenien ilmentyminen edistää suolistosyövän kehittymistä, koska ne ehkäisevät apoptoosia eli ohjelmoitua solukuolemaa ja solujen erilaistumista sekä lisäävät solujen jakautumista (ks. Brabletz ym. 2005).

β -kateniinia ei ainoastaan säädellä sen hajottamisen avulla, vaan viime vuosina tutkijat ovat havainneet β -kateniinin fosforyloitumisen säätelevän sen toimintaa (ks. Daugherty & Gottardi 2007). β -kateniinia voidaan fosforyloid monesta aminohappotähteestä, mikä voi vaikuttaa sen pysyvyyteen, sijaintiin solussa, kykyyn osallistua soluliitoksen rakenneosana tai edistää geenien ilmentymistä (ks. Daugherty & Gottardi 2007). β -kateniinin fosforylaatio on tärkeä suolistosyövän etiologian kannalta, sillä se mahdollistaa β -kateniinin osallistumisen solujen jakautumiseen, vaikka β -kateniinipitoisuus olisi pieni (ks. Clevers & Nusse 2012).

Ravintotekijöiden vaikutusta β -kateniinin määrään ja toimintaan solussa on tutkittu paljon eläin- ja solumalleissa. Sen sijaan ainoastaan yksittäisiä tutkimuksia on julkaistu ravinnon vaikutuksesta β -kateniinin fosforyloitumiseen. Tämän pro gradu -tutkielman tavoitteena oli optimoida ja kehittää edelleen fluoresenssiin perustuvaa Western blotting -menetelmää kaupallisilla vasta-aineilla määritettäville β -kateniinin fosforylaatiomudoille. Optimoitua menetelmää hyödynnettiin määrittämällä proto-onkogeenien ilmentymistä edistävien fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinipitoisuudet näytteistä, jotka olivat peräisin kahdesta osastolla aiemmin Apc^{Min}-hiirillä tehdystä dieettitutkimuksesta.

2 Kirjallisuuskatsaus

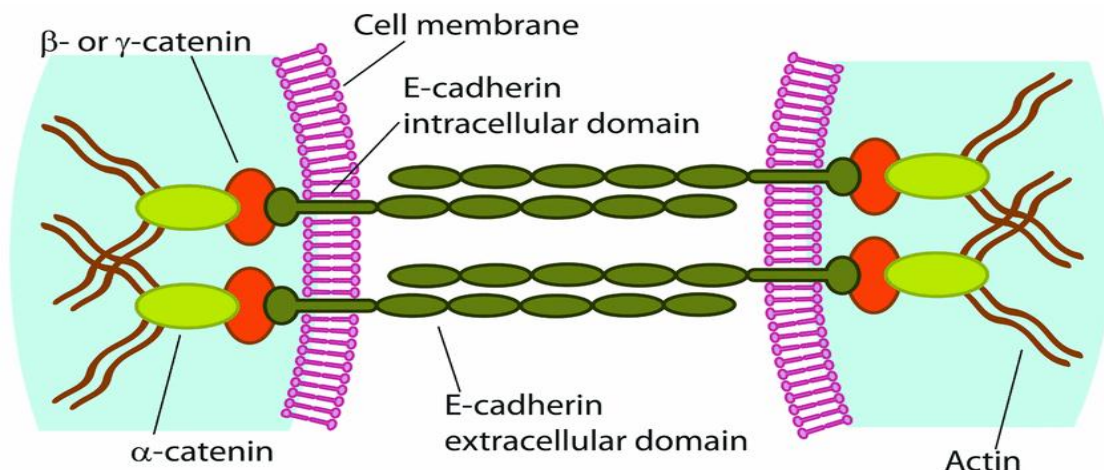
2.1 β -kateniinin rakenne ja tehtävät

β -kateniini on solussa esiintyvä 92 kD:n painoinen proteiini (Knudsen & Wheelock 1992). β -kateniini koostuu N- ja C-terminaalisesta päästä sekä ns. armadillo -nimisestä toiminnallisesta yksiköstä (Huber ym. 1997). Tutkijat löysivät ensimmäisen kerran kateniiniperheeseen kuuluvan β -kateniinin, kun he havaitsivat sen toimivan osana soluliitoksia (ks. McCrea & Gu 2010). Myöhemmin β -kateniinin on havaittu olevan keskeinen proteiini paksusuolisyövän kehittämisessä, sillä se säätelee solujen homeostasiasia kuten solujen jakautumista ja erilaistumista säätelemällä geenien ilmentymistä (ks. Clevers 2006).

Normaalitilassa β -kateniini toimii osana soluliitoksia. Sytoplasmassa oleva β -kateniini hajotetaan, mikä estää β -kateniinin siirtymisen tumaan edistämään geenien ilmentymistä (ks. MacDonald ym. 2009). Solun ulkoiset tai sisäiset ärsykkeet käynnistävät ns. Wnt-reitin (engl. Wingless Int-1), mikä mahdollistaa β -kateniinin osallistumisen geenien ilmentymiseen. Wnt-reitin aktivoituminen estää β -kateniinin hajottamista, jolloin sytosolissa vapaana oleva β -kateniini pystyy siirtymään tumaan edistämään geenien ilmentymistä (ks. MacDonald ym. 2009).

2.1.1 β -kateniini soluliitosten ja solun tukirangan osana

β -kateniini toimii soluissa adherenssiliitoksen osana muodostamalla kadheriini-kateniini-kompleksin E-kadheriinin ja α -kateniinin kanssa (ks. Daugherty & Gottardi 2007). Integriinisen E-kadheriinin ns. ekto-niminen polypeptidiketju sitoutuu naapurisolujen E-kadheriineihin kalsiumioneista riippuvaisella tavalla ja α -kateniini toimii osana solun tukirakennetta sytoplasmassa (Ks. kuva 1). β -kateniini sitoo E-kadheriinin α -kateniiniin sytoplasmassa.



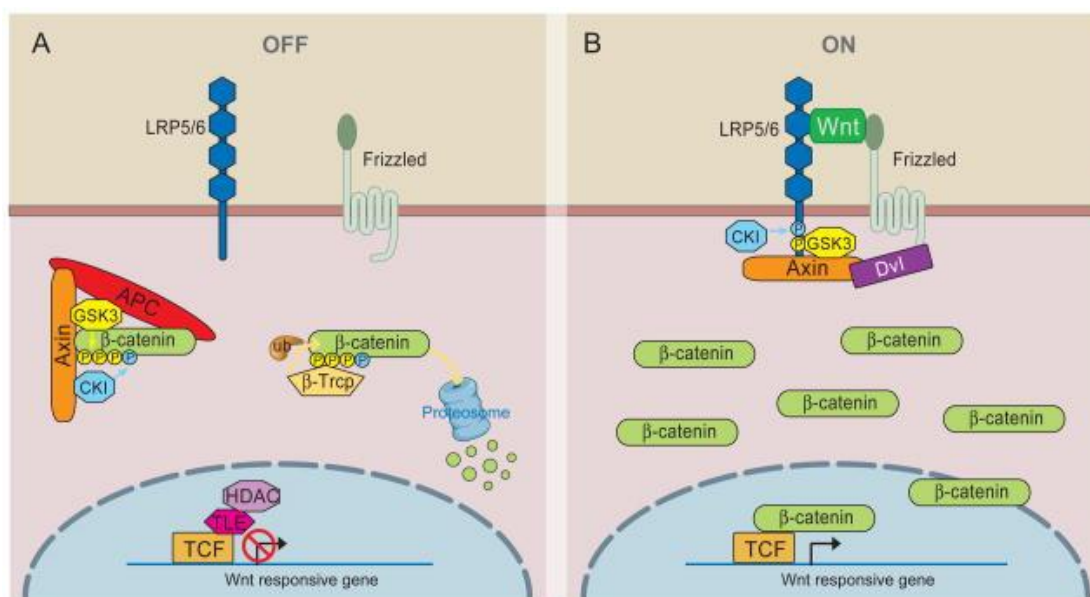
Kuva 1. β -kateniini adherenssiliitoksessa (Perry ym. 2009).

β -kateniinin tehtävä on edistää endoplasmisessa retikkelissä valmistetun E-kadheriinin siirtymistä solukalvolle, estää E-kadheriinin irtoamista solukalvolta ja sitoa α -kateniinia soluliitoksiin (ks. Daugherty & Gottardi 2007). E-kadheriini välittää viestejä solun sisään ja toimii rakenteellisena osana (ks. Daugherty & Gottardi 2007), kun taas α -kateniini säätelee solun tukirangan aktiinin järjestäytymistä (Drees ym. 2005).

Tutkijat ovat kiistelleet siitä, rekrytoidaanko soluliitoksen β -kateniinia tumaan (ks. Gottardi & Peifer 2008). Tutkimuksissa on havaittu, että fosfaattiryhmän liittyminen tiettyihin tyrosiiniaminohappotähteisiin saa aikaan β -kateniinin irtoamisen solukalvolta ja siirtymisen tumaan käynnistämään geenien ilmentymistä (ks. Harris & Peifer 2005). Osa tutkijoista on kuitenkin sitä mieltä, että soluliitokset ovat pysyviä ja ne hajoavat ainoastaan tietyissä fysiologisissa tilanteissa kuten sikiökehitysvaiheissa (ks. Daugherty & Gottardi 2007, Clevers & Nusse 2012).

2.1.2 β -kateniini Wnt-reitin geenien ilmentymisen edistäjänä

β -kateniinin määrää solussa säädellään hajotuksen kautta, sillä β -kateniinia rakennetaan tasaisella nopeudella solun tilasta riippumatta (Maher ym. 2010). Normaalityltilassa vapaana sytosolissa olevaa β -kateniinia hajotetaan, mikä estää β -kateniinia osallistumasta solun homeostasiaa säätelevään Wnt-reitin toimintaan (ks. kuva 2A, MacDonald ym. 2009). Wnt-reittiä aktivoivat tekijät taas estävät β -kateniinia hajottavan kompleksin toimintaa ja siten mahdollistavat sytosolin β -kateniinin siirtymisen tumaan edistämään β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä (ks. kuva 2B, MacDonald ym. 2009).



Kuva 2. Wnt-reitti (A) Wnt-reitin ollessa poissa toiminnasta (B) Wnt-reitin ollessa toiminnassa (MacDonald ym. 2009).

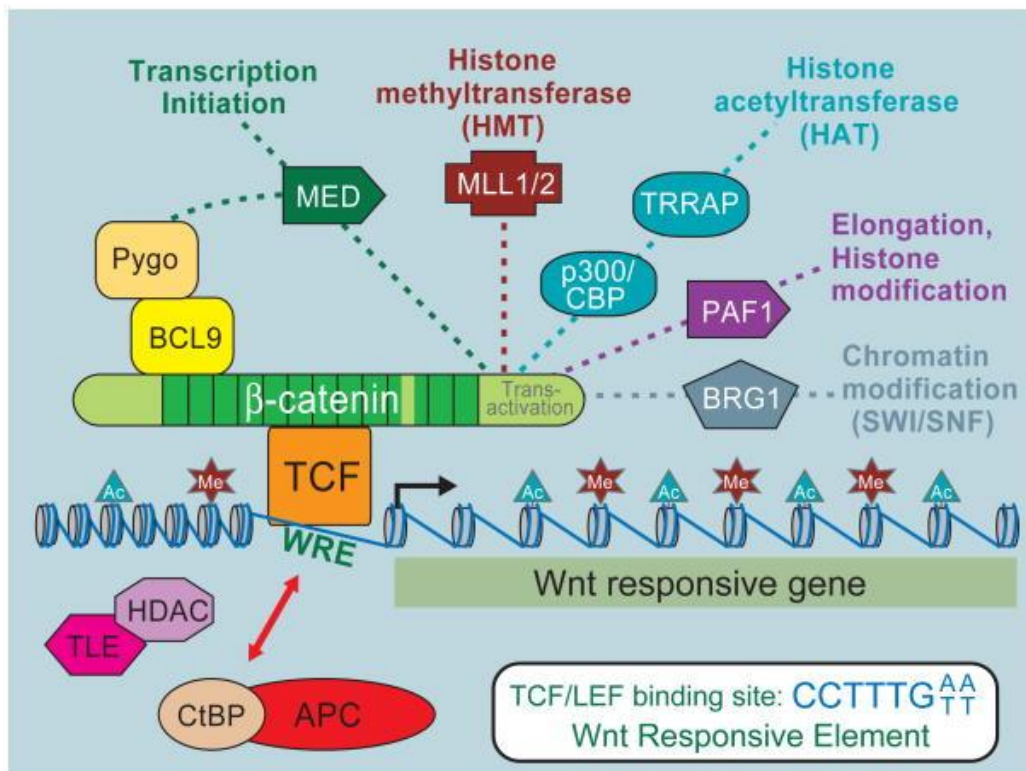
Solun normaalitilassa aksiiniproteiini avustaa β -kateniinin hajottamista sitomalla β -kateniinin, APC:n ja β -kateniinin fosforylointiin osallistuvien kaseinikinaasi 1 α :n (CK1 α) ja glykogeenisyntaasikinaasi 3 α / β :n (GSK3 α / β) samaan kompleksiin (ks. kuva 2A, MacDonald ym. 2009). Näiden proteiinien sitominen kompleksiin helpottaa β -kateniinin hajottamista, sillä se mahdollistaa β -kateniinin hajottamiseen osallistuvien proteiinien vuorovaikutuksen β -kateniinin kanssa. β -kateniinin hajotus alkaa, kun CK1 α fosforyloi β -kateniinin seriini45-aminohappotähteestä. Tämän jälkeen GSK3 α / β fosforyloi treoniini41-, seriini37- ja seriini33-aminohappotähteet (ks. MacDonald ym. 2009). APC-proteiini estää proteiinifosfataasi 2A:ta (PP2A) defosforyloimasta fosfo-Thr41/Ser33/37/45- β -kateniinia, mikä takaa sen, että β -TrCP (engl. beta-transducin repeat-containing protein) tunnistaa fosforyloidun β -kateniinin seriini33- ja seriini37-aminohappotähteistä ja liittää β -kateniiniin ubikitiinejä (Su ym. 2008, ks. MacDonald ym. 2009). Ubikitiinien liittäminen β -kateniiniin on viesti solulle siitä, että β -kateniini ohjataan proteasomiin hajotettavaksi.

Wnt-reitti aktivoituu, kun solun ulkoinen Wnt-substraatti sitoutuu Frizzled-reseptoriin (ks. kuva 2B, MacDonald ym. 2009). Wnt-substraatti, Frizzled ja LRP5/6 (engl. LDL receptor-related proteins 5/6) – koreseptorit muodostavat kompleksin. Frizzled rekrytoi sytoplasmassa sijaitsevan Dishevelled-proteiinin. Tämä saa aikaan sen, että GSK3 ja CK1 fosforyloivat LRP5/6:n. LRP5/6:n fosforyloitumisen seurauksena β -kateniinin hajottamiseen osallistuva aksiini liittyy kompleksiin, mikä estää aksiinivälitteisen β -kateniinin hajottamisen. Hajotuksen estyminen lisää vapaan β -kateniinin määrää sytosolissa, mikä mahdollistaa β -kateniinin siirtymiseen tumaan edistämään β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä.

Vielä ei tiedetä, miten β -kateniinia kuljetetaan sytoplasmasta tumaan (ks. Clevers & Nusse 2012). Monissa tapauksissa Wnt-reitin käynnistyminen lisää β -kateniinin määrää ilman, että β -kateniinin määrä lisääntyy merkittävästi tumassa (ks. Clevers & Nusse 2012). Viimeaikainen tutkimusnäyttö viittaa siihen, että β -kateniinia kuljetetaan sytosolista tumaan mikrotubulusten tai aktiivisen kuljetuksen avulla (ks. Clevers & Nusse 2012).

Tumassa β -kateniini toimii TCF (engl. T cell factor) ja LEF (engl. lymphocyte enhancer factor) -nimisten transkriptiotekijöiden koaktivaattorina (ks. MacDonald ym. 2009). Transkriptiotekijät ovat geenien ilmentymistä sääteleviä proteiineja, jotka sitoutuvat geenin ilmentymistä säätelevään deoksiribonukleiinihappo-sekvenssin (DNA) alueelle (ks. Heino & Vuento 2007a). Transkriptiotekijöiden kykyä käynnistää transkriptio säätelevät siihen sitoutuvat koaktivaattorit

kuten β -kateniin ja korepressorit (Daniels & Weis 2005, ks. MacDonald ym. 2009). Solun normaalitilassa tumassa korepressorina toimiva TLE-proteiini (engl. transducin-like enhancer of split) on sitoutunut TCF ja LEF transkriptiotekijöihin (ks. MacDonald ym. 2009), mikä estää β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä. β -kateniinin siirtyessä tumaan se syrjäyttää TCF:ään ja LEF:iin sitoutuneen korepressorina toimivan TLE:n (ks. kuva 3). β -kateniiniin sitoutuu lukuisia koaktivaattoreita, jotka edistävät TCF:n ja LEF:n välitteistä geenien ilmentymistä (ks. kuva 3, MacDonald ym. 2009). Kaikilla koaktivaattoreilla on ominainen tehtävänsä geenien ilmentymisen edistämässä. Ne edistävät mm. transkription aloittamista ja etenemistä, sitovat metyyliryhmiä kromatiiniin ja muokkavat histonien rakennetta (ks. MacDonald ym. 2009).

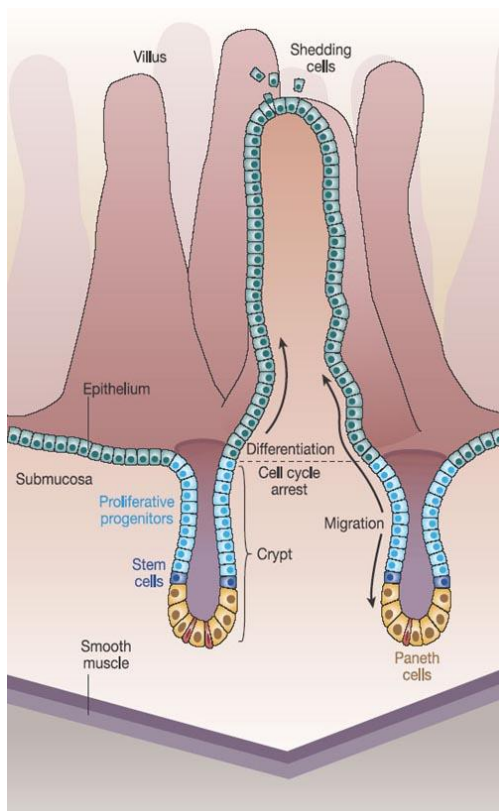


Kuva 3. β -kateniinin vuorovaikutus koaktivaattorien, TCF-transkriptiotekijän kanssa (MacDonald ym. 2009).

Suurin osa Wnt-reitin kohdegeeneistä ovat riippuvaisia solutyypistä ja olosuhteista (ks. Clevers 2006). Suoliston epiteelissä Wnt-reitti edistää kantasolujen jakautumista ja siten välivahvistinsolujen muodostumista sekä suoliston immuunipuolustuksesta vastaavien Paneth-solujen erilaistumista (ks. Clevers ym. 2006). Wnt-reitti on suoliston epiteelille erityisen tärkeä, sillä suoliston epiteelisolut uusiutuvat 3-5 päivän välein.

Suoliston epiteeli poimuttuu muodostaen nukkalisäkkeitä eli villuksia ja Lieberkuhnin suolirauhasia eli kryptia (ks. kuva 4, Reya & Clevers 2005). Suolen epiteelin kantasolut tuottavat kryptan pohjalla välivahvistinsoluja, jotka jakautuvat kryptassa (ks. kuva 4, Reya & Clevers 2005). Kryptan epiteelisolut kulkeutuvat tasaisella vauhdilla kohti villusta (ks. Clevers 2006). Villuksessa välivahvistinsolut erilaistuvat epiteelisoluiksi (ks. Reya & Clevers 2005). Epiteelisolujen saavuttaessa villuksen kärjen ne käyvät läpi ohjelmoidun solukuoleman ja irtoavat luumeniin.

Reyan ja Cleversin mukaan (2005) Wnt-reitti on tärkein yksittäinen suoliston epiteelin toimintaa säätelevä tekijä, sillä Wnt-reittiä tarvitaan välivahvistinsolujen muodostumiseen kantasoluista. Wnt-reitin aktiivisuus onkin suurin kryptan pohjassa, jossa se edistää kantasolujen ja välivahvistinsolujen jakautumista (ks. Radtke & Clevers 2005, Clevers 2006). Wnt-reitin aktiivisuus pienenee siirtyessä kohti villusta (ks. Clevers 2006, van der Flier & Clevers 2009). Wnt-reitin toiminnan heikkeneminen kohti villusta ehkäisee välivahvistinsolujen jakautumista, edistää välivahvistinsolujen erilaistumista epiteelisoluiksi kryptassa ja epiteelisolujen apoptoosia villuksen kärjessä (ks. Clevers 2006), sillä Wnt-reitti edistää solujen jakautumista sekä ehkäisee solujen erilaistumista ja apoptoosia (ks. Brabletz ym. 2005, Clevers & Nusse 2012).



Kuva 4. Suolen limakalvon rakenne, jossa näkyvät mm. kryptat ja villukset (Reya & Clevers 2005).

2.1.3 β -kateniini solusyklin säätelijänä

β -kateniini todennäköisesti osallistuu solusyklin säätelyyn, sillä β -kateniinin määrä sytosolissa ja tumassa vaihtelee solusyklin eri vaiheissa (Olmeda ym. 2003, Kaplan ym. 2004, Huang ym. 2007). β -kateniini voi vaikuttaa solusykliin säätelämällä tumasukkulan rakennetta ja toimintaa (Kaplan ym. 2004, Huang ym. 2007).

Solukierto koostuu neljästä vaiheesta (ks. Heino & Vuento 2007b). G1-vaiheessa solun koko kasvaa transkription ja translaation seurauksena. Sitä seuraa S-vaihe, jossa DNA kahdentuu. G2-vaiheessa solu valmistautuu solun jakautumiseen tuottamalla siihen tarvittavia proteiineja. M-vaiheessa eli mitoosissa solu jakautuu. G1-, S- ja G2-vaihetta kutsutaan interfaasiksi. Interfaasin aikana kaksi sentriolia eli mikrotubulusten organisaatiokeskusta siirtyy kromosomin vastakkaisille puolille. Mikrotubulukset sitoutuvat sentrioleihin ja toisiinsa muodostaen rihmoja muistuttavan rakenteen eli tumasukkulan (engl. nuclear spindle). Tumasukkula kiinnittyy kromosomiin kinetokorin välityksellä. Vastakkaiset tumasukkulat vetävät tytärkromatidit erilleen ja tuma hajoaa muodostaen kaksi tytärtumaa. Sitä seuraa sytokineesi, jossa tytärsolut eriytyvät toisistaan.

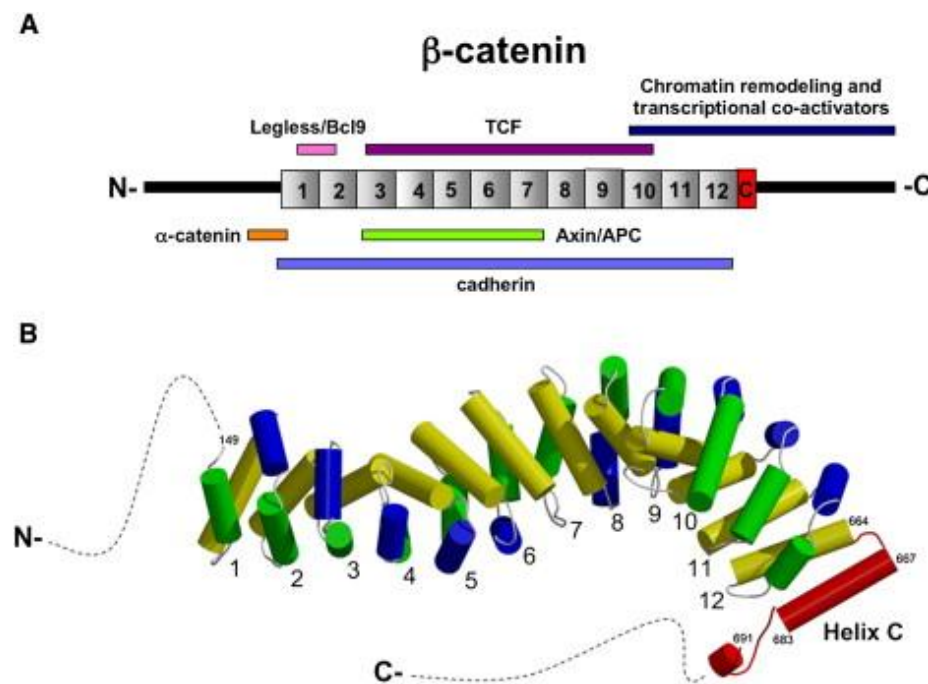
Olmeda tutkimusryhmineen (2003) havaitsi, että sytosolin ja tuman β -kateniinipitoisuudet alkoivat suurentua keratinosyyteissä solusyklin S-vaiheessa ja saavuttivat huippunsa G2-vaiheen loppupuolella ja mitoosissa. Kun solu palautui G1-vaiheeseen, β -kateniinipitoisuus tumassa pieneni nopeasti. Tutkimuksessa β -kateniinin osallistumista solusykliin tukee se, että β -kateniinin säätelyn häiriintyminen pysäytti solun jakautumisen: Liiallinen pysyvä β -kateniinin tuottaminen tai β -kateniinin hajottamisen estäminen pysäytti solusyklin G2-vaiheen ja johti keratinosyyttisolujen apoptoosiin (Olmeda ym. 2003).

β -kateniinin kyky säädellä solusykliä voi selittyä sen vuorovaikutuksella tumasukkulan kanssa. Kaplanin ym. (2004) tutkimuksessa β -kateniini sitoutui tuman mikrotubuluksiin sekä osallistui tumasukkulan syntyyn ja sentriolien irtautumiseen toisistaan L-soluissa. Myöhemmin Huang ym. (2007) havaitsivat fibroblasteja tutkiessaan, että G2-vaiheessa ja mitoosissa tumasukkulan sentrosomiin oli sitoutunut N-terminaalisesta päästä fosforyloitu β -kateniini. Kuten Olmedan ym. (2003) tutkimuksessa β -kateniinin määrä riippui solusyklin vaiheista; myös fosfo- β -kateniinin määrä lisääntyi S-vaiheessa saavuttaen huippunsa G2-vaiheen loppupuolella ja mitoosissa (Huang ym. 2007). Tutkimustulokset viittaavat siihen, että tumassa oleva β -kateniini siirtyy sytoplasmaan

hajotettavaksi, kun tumakalvo hajoaa solun jakautuessa (Huang ym. 2007). Näiden tutkimusten perusteella N-terminaalisesta päästä fosforyloitu β -kateniini osallistuu solusyklin säätelyyn.

2.2 β -kateniini ja sen erilaiset fosforylaatiomuodot

Hajottamisen lisäksi β -kateniinin toimintaa ohjataan β -kateniinin konformaation eli kolmiulotteisen rakenteen muutoksilla (ks. Harris & Peifer 2005). β -kateniini koostuu kolmesta yksiköstä: armadillo-nimisestä toiminnallisesta yksikköstä sekä lähinnä rakenteellisina yksikköinä toimivista N- ja C-terminaalisista päistä (ks. kuva 5B, Harris & Peifer 2005). Negatiivisesti varautuneet N- ja C-terminaaliset päät ympäröivät positiivisesti varautunutta armadilloa ja siten suojelevat armadilloa muiden proteiinien epäspesifiseltä vuorovaikutukselta. N- ja C-terminaaliset päät säätelevät sitä, mitkä negatiivisesti varautuneet kohdeproteiinit kykenevät vuorovaikuttamaan armadillon kanssa (ks. Harris & Peifer 2005). Lisäksi ne rekrytoivat geenien ilmentymistä sääteleviä koaktivaattoreita ja -repressoreita tumassa (ks. Daugherty & Gottardi 2007). N-terminaalinen pää rekrytoi soluliitoksiin ja solun tukirankaan osallistuvaa α -kateniinia ja sen fosforyloituminen antaa solulle käskyn hajottaa β -kateniini (ks. Gottardi & Peifer 2008).



Kuva 5. (A) Kohdeproteiinien sitoutumiskohtia β -kateniinissa (B) β -kateniinin kolmiulotteinen rakenne (Gottardi & Peifer 2008).

β -kateniinin konformaatioita säädellään β -kateniinin translaation jälkeisellä muokkaamisella kuten fosforylaatiolla (ks. Harris & Peifer 2005). Negatiivisesti varautuneen fosfaattiryhmän sitoutuminen β -kateniinin aminohappotähteeseen muuttaa β -kateniinin kolmiulotteista rakennetta, sillä sen seurauksena heikkoja eli ei-kovalenttisia sidoksia hajoaa ja niiden tilalle syntyy uusia (Piedra ym. 2001). Konformaatiomuutos muuttaa armadillon, N- ja C-terminaalisten päiden asemaa suhteessa toisiinsa, minkä seurauksena kohdeproteiinien kyky sitoutua armadilloon muuttuu (Piedra ym. 2001). β -kateniinin kolmiulotteisen rakenteen muuttuminen voi joko edistää tai estää kohdeproteiinien kykyä vuorovaikuttaa armadillon kanssa. β -kateniinia voidaan fosforyloid monesta aminohappotähteestä ja niitä voi olla fosforyloituneena samaanaikaan yksi tai useampi. Kullakin β -kateniinin fosforylaatiostatuksella on ominainen vaikutus β -kateniinin toimintaan solussa.

Fosforyloimattomalla β -kateniinilla on suurin affiniteetti soluliitosten osana toimivaan E-kadheriiniin (Piedra ym. 2001). Sytosolissa oleva E-kadheriiniin sitoutumaton β -kateniini siirtyy hajotettavaksi (ks. MacDonald ym. 2009), mikäli β -kateniinia ei ole fosforyloitu aminohappotähteistä, jotka estävät β -kateniinin hajottamisen ja/tai edistävät sen siirtymistä tumaan (Hino ym. 2005). Seuraavissa kappaleissa käsitellään β -kateniinin aminohappotähteiden fosforylaation vaikutusta sen hajottamiseen ja toimintaan solussa.

2.2.1 Tyrosiinitähteiden fosforylaatio

Viimeaikaiset tutkimukset viittaavat siihen, että β -kateniinin tyrosiinitähteiden fosforylaatio estää β -kateniinia osallistumasta soluliitoksiin (Piedra ym. 2001 ja 2003). Lisäksi se voi lisätä β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä edistämällä β -kateniinin siirtymistä tumaan ja kykyä sitoutua ilmentymistä säätelevien proteiineihin (Piedra ym. 2001, Brembeck ym. 2004, Zeng ym. 2006). Tutkimusnäyttöä on saatu etenkin fosfo-Tyr142- ja fosfo-Tyr654- β -kateniinin osalta.

Piedran ym. (2003) tutkimuksen mukaan tyrosiini142-aminohappotähteen fosforyloituminen esti β -kateniinia sitoutumasta solun tukirankaa säätelevään α -kateniiniin IEC18 K-ras-soluilla (Piedra ym. 2003). Lisäksi tyrosiini142-aminohappotähteen fosforylaatio edisti β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä lisäämällä β -kateniinin siirtymistä tumaan ja sen kykyä sitoutua transkriptiotekijä BCL9-2:een rotan hepatoomasoluissa (Piedra ym. 2003, Brembeck ym. 2004). Näiden tulosten perusteella β -kateniinin fosforyloituminen tyrosiini142-aminohappotähteestä ehkäisee β -kateniinin osallistumista soluliitoksiin ja lisää kohdegeenien ilmentymistä edistämällä sen siirtymistä tumaan ja sitoutumista transkriptiotekijä BCL9-2:een.

Fosfaattiryhmän liittyminen β -kateniinin tyrosiini654-aminohappotähteeseen puolestaan heikensi β -kateniinin sitoutumiskykyä E-kadheriiniin Caco-2-soluissa, edisti β -kateniinin siirtymistä tumaan BCL9-2-siirtogeenisessä HEK293-solulinjassa (engl. human embryonic kidney 293 cell) ja lisäsi β -kateniinin sitoutumiskykyä transkriptiotekijä TATA-sitojaproteiiniin (TBP) SW480-soluissa (Roura ym. 1999, Piedra ym. 2001, Zeng ym. 2006). Näyttäisi siis siltä, että β -kateniinin fosforyloituminen tyrosiini654-aminohappotähteestä estää β -kateniinia sitoutumasta soluliitoksiin sekä edistää sen siirtymistä tumaan ja kykyä sitoutua transkriptiotekijä TBP:hen, jonka seurauksena β -kateniinin kohdegeenien ilmentyminen lisääntyy.

Näiden tulosten perusteella β -kateniinin tyrosiinitähteiden fosforyloituminen estää β -kateniinia osallistumasta soluliitoksiin ehkäisemällä β -kateniinin sitoutumista soluliitosten osana toimiviin E-kadheriiniin tai α -kateniiniin. Lisäksi fosfo-Tyr- β -kateniini voi edistää geenien ilmentymistä lisäämällä β -kateniinin siirtymistä tumaan ja sen vuorovaikutusta geenien ilmentymistä säätelevien proteiinien kuten BCL9-2:n ja TBP:n kanssa.

2.2.2 Treoniinitähteiden fosforylaatio

β -kateniinin treoniiniaminohappotähteiden fosforylaatio voi vaikuttaa β -kateniinin pysyvyyteen sekä sen kykyyn edistää geenien ilmentymistä ja sitoutua soluliitoksen α -kateniiniin (Song ym. 2003, Bek & Kemler 2002). Kaseinikinaasi 2 (CK2) kykenee fosforyloimaan β -kateniinin treoniintähteitä N-terminaalista päästä ja armadillosta. CK2:n merkitys β -kateniinin toiminnalle riippuu siitä, minkä osan β -kateniinista CK2 fosforyloi (Song ym. 2003, Bek & Kemler 2002).

CK2:n on havaittu fosforyloivan β -kateniinin armadillon treoniini393-aminohappotähteestä (Song ym. 2000, Song ym. 2003, Wu ym. 2009). Tutkimuksissa β -kateniinin fosforylaatio treoniini393-aminohappotähteestä on vähentänyt β -kateniinin hajottamista ja lisännyt β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä (Song ym. 2003, Wu ym. 2009). Näyttäisi siltä, että fosfo-Thr393- β -kateniinia hajotetaan vähemmän, koska sen kyky sitoutua hajottamiskompleksin muodostavaan aksiiniin on heikentynyt (Wu ym. 2009). Yhteenvetona voidaan sanoa, että treoniini393-aminohappotähteen fosforylaatio vähentää β -kateniinin hajottamista estämällä β -kateniinin liittymisen hajottamiskompleksiin ja lisää β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä.

Bekin ja Kemlerin (2002) tutkimuksessa CK2 fosforyloi β -kateniinin N-terminaalisen päänsä seriini29-, treoniini102- ja treoniini112-aminohappotähteistä ihmisten munuaisten epiteelisoluissa. β -kateniinin fosforyloituminen seriini29-, treoniini102- ja treoniini112-aminohappotähteistä voi ehkäistä β -kateniinin osallistumista Wnt-reittiin, sillä fosfo-Ser29-Thr102-Thr112- β -kateniinia hajotettiin enemmän ja sillä oli suurempi affiniteetti soluliitoksen α -kateniiniin verrattuna toimimattomaan β -kateniiniin (S29A/T102A/T112Q) (Bek & Kemler 2002). Näyttäisi siis siltä, että β -kateniinin fosforyloituminen seriini29-, treoniini102- ja treoniini112-aminohappotähteistä edistää β -kateniinin hajottamista ja lisää sen sitoutumista soluliitoksen α -kateniiniin. Tämä voi ehkäistä β -kateniinia osallistumasta Wnt-reittiin, koska se vähentää sytosolissa vapaana olevaa β -kateniinin määrää (ks. MacDonald ym. 2009).

Tulosten perusteella β -kateniinin fosforyloituminen treoniini393-aminohappotähteestä näyttäisi edistävän Wnt-reitin toimintaa, kun taas sen fosforyloituminen N-terminaalisen päänsä seriini29-, treoniini102- ja treoniini112-aminohappotähteistä ehkäisee β -kateniinia osallistumasta Wnt-reittiin. β -kateniinin fosforyloituminen treoniini393-aminohappotähteestä saattaa vähentää β -kateniinin hajottamista estämällä β -kateniinia sitoutumasta hajottamiskompleksin muodostavaan aksiniin. Tämän vaikutuksesta sytosolissa vapaana olevan β -kateniinin määrä lisääntyy, mikä mahdollistaa β -kateniinin siirtymisen tumaan edistämään geenien ilmentymistä. Sen sijaan β -kateniinin fosforyloituminen seriini29-, treoniini102- ja treoniini112-aminohappotähteistä lisää β -kateniinin hajottamista ja sen sitoutumiskykyä soluliitosten osana toimivaan α -kateniiniin. Tämän seurauksena sytosolissa vapaana olevan β -kateniinin määrä vähenee, mikä ehkäisee β -kateniinin siirtymistä tumaan edistämään geenien ilmentymistä.

2.2.3 Seriinitähteiden fosforylaatio

Fosfaattiryhmän liittyminen β -kateniinin seriinitähteisiin edistää geenien ilmentymistä (Hino ym. 2005, Fang ym. 2007). Tutkimusnäyttö on vahvaa etenkin seriini552- ja seriini675-aminohappotähteiden osalta (Hino ym. 2005, Fang ym. 2007). Sen vuoksi tässä kappaleessa keskitytäänkin siihen, miten seriini675- ja seriini552-aminohappotähteiden fosforylaatio vaikuttaa β -kateniinin toimintaan.

Taulukkoon 1 on kerätty julkaisuja, joissa on tutkittu fosfo-Ser552- β -kateniinin toimintaa solussa. Näiden artikkeleiden perusteella voidaan sanoa, että β -kateniinin fosforylaatio seriini552-aminohappotähteestä lisää β -kateniinin siirtymistä tumaan. Jonkin verran näyttöä on myös saatu siitä, että se edistää β -kateniinin irtoamista soluliitoksista.

Taulukko 1. β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä ja sen vaikutus β -kateniinin toimintaan soluissa.

Tutkimus	Solutyyppi	Irtoaminen soluliitoksista	Pysyvyys	Siirtyminen tumaan
Maher ym. 2010	SW480-solut	—	*	*
He ym. 2007	Suoliston kanta-, esi- ja Paneth-solut	*	*	↑
Fang ym. 2007	293T- ja A431-solut	↑	—	↑
Lee ym. 2010	Suoliston epiteelisolut	*	*	↑
Rey ym. 2012	NCMiCaR-solut	*	*	↑
Taurin ym. 2006	COS7 ja HEK293-solut	—	—	—

* Ei mitattu

— Ei vaikutusta

↑ Edistävä vaikutus

Tutkimukset viittaavat siihen, ettei β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä ehkäise β -kateniinin hajottamista (Taurin ym. 2006, Fang ym. 2007). Seriini552-aminohappotähteestä inaktivoitu (Ser552A) ja aktivoitu (Ser552D) β -kateniini ei vaikuttanut β -kateniinin hajottamiseen osallistuvan GSK3 β :n kykyyn fosforyloida β -kateniini N-terminaalista päästä eikä se muuttanut β -kateniinin puoliintumisaikaa verrattuna normaaliin (engl. wild type) β -kateniiniin (Fang ym. 2007). Sama tulos saatiin Taurinin ym. (2006) tutkimuksessa, jossa β -kateniinin fosforyloituminen seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä saatiin aikaan käsittelemällä HEK293-soluja proteiinikinaasi A:n katalyyttisellä alayksiköllä (PKAc). β -kateniinin määrässä ei ollut eroa verrattaessa toimivan fosfo-Ser552/675- β -kateniinin ja toimimattoman β -kateniinin (Se552A/Ser675A, Ser675A ja Ser552A) määrään. Yhteenvetona voidaan sanoa, ettei β -kateniinin fosforylaatio seriini552-aminohappotähteestä vaikuta β -kateniinin hajottamiseen.

β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä saattaa edistää β -kateniinin irtoamista solukalvolta. Ajatusta tukee Fangin ym. (2007) tutkimus, jossa inaktivoitua 552A- β -kateniinia oli enemmän soluliitoksissa verrattuna kokonais- β -kateniiniin. Taurinin ym. (2006) tutkimus taas puoltaa sitä, ettei β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä edistä β -kateniinin irtoamista solukalvolta. Tutkimuksessa forskoliinikäsittelyn aikaansaama β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä ei vaikuttanut β -kateniinin

sijoittumiseen solukalvolla verrattaessa inaktivoituun β -kateniiniin (Ser552A/Ser675A, Ser675A ja Ser552A) COS7-soluissa. Maherin ym. (2010) tutkimus taas osoittaa sen, ettei β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä ainakaan automaattisesti saa aikaan β -kateniinin irtoamista solukalvolta, sillä fosfo-Ser552- β -kateniini kykeni olemaan osana soluliitosta. Tutkimuksessa fosfo-Ser552- β -kateniini oli sitoutunut E-kadheriiniin SW480-solujen lysaatissa, jossa E-kadheriiniin sitoutumaton β -kateniini oli eristetty. Yhteenvetona voidaan sanoa, että fosfo-Ser552- β -kateniini kykenee osallistumaan soluliitoksiin. Tästä huolimatta on kuitenkin mahdollista, että fosfo-Ser552- β -kateniini pystyy rekrytoimaan tekijöitä, jotka irrottavat β -kateniinin soluliitoksesta.

β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä todennäköisesti edistää β -kateniinin siirtymistä tumaan. He ym. (2007) havaitsivat immunohistokemian avulla, että fosfo-Ser552- β -kateniinia oli kerääntynyt tumaan suoliston kanta- ja välivahvistinsoluissa ja osassa Panethin soluista. Tutkimuksissa on myös osoitettu, että β -kateniinin seriini552-aminohappotähteen fosforylaatio edistää β -kateniinin siirtymistä tumaan, ja että β -kateniinin fosforyloitumisen ehkäiseminen seriini552-aminohappotähteestä vähentää fosfo-Ser552- β -kateniinin määrää merkitsevästi tumassa (Fang ym. 2007, Lee ym. 2010, Rey ym. 2012). Fangin ym. (2007) mukaan fosfo-Ser552- β -kateniini saattaa siirtyä tumaan 14-3-3 ζ :n avustuksella. Tutkimuksessa β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä lisäsi β -kateniinin affiniteettia 14-3-3 ζ :een, mikä on saattanut edistää β -kateniinin siirtymistä tumaan, sillä 14-3-3 ζ :n säätelee siihen sitoutuneiden proteiinien sijaintia solussa (Brunet ym. 2002). Vaikka monet tutkimukset viittaavat β -kateniinin fosforyloitumisen seriini552-aminohappotähteestä ohjaavan β -kateniinin sijoittumista solussa, Taurinin ym. (2006) tutkimus ei tue tätä käsitystä. Taurinin ym. (2006) tutkimuksessa β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä ei vaikuttanut β -kateniinin sijoittumiseen tumassa verrattaessa inaktivoituun β -kateniiniin (Ser552A/Ser675A, Ser675A ja Ser552A) COS7-soluissa. Näiden tutkimusten perusteella voidaan ajatella, että β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä edistää β -kateniinin siirtymistä tumaan.

β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä voi lisätä β -kateniinin pysyvyyttä ja vuorovaikutusta koaktivaattorina toimivan CREB-sitojaproteiinin (CBP) kanssa (ks. taulukko 2). Myös joitain viitteitä on saatu siitä, että se edistäisi β -kateniinin siirtymistä tumaan, mutta näyttö ei ole vakuuttavaa.

Taulukko 2. β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä ja sen vaikutus β -kateniinin toimintaan.

Tutkimus	Solutyyppi	Pysyvyys	Vuorovaikutusta geenien koaktivaattoreihin	Siirtyminen tumaan
Hino ym. 2005	COS7-solut	↑	*	↑
Taurin ym. 2006	COS7- ja HEK293-solut	—	↑	—
Zhu ym. 2012	SW480-solut	↑	*	—
Li ym. 2012	COS-7-solut	↑	*	*

* Ei mitattu

— Ei vaikutusta

↑ Edistävä vaikutus

Tutkimuksissa on saatu ristiriitaisia tuloksia sen suhteen, lisääkö fosfaattiryhmän liittyminen β -kateniinin seriini675-aminohappotähteeseen β -kateniinin pysyvyyttä. Suurin osa tutkimuksista tukee kuitenkin ajatusta, että β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä vähentää β -kateniinin hajottamista (Hino ym. 2005, Li ym. 2012, Zhu ym. 2012). Fosfo-Ser675- β -kateniinin lisääntynyt pysyvyys voi selittyä vähentyneellä ubikitiiniryhmän sitoutumisella β -kateniiniin (Hino ym. 2005, Zhu ym. 2012). Tämä ehkäisee β -kateniinin hajottamista, sillä ubikitiiniryhmän liittyminen β -kateniiniin antaa solulle käskyn siirtää β -kateniini proteasomiin hajotettavaksi. Sen sijaan Taurinin ym. (2006) tutkimuksessa β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä ei vähentänyt β -kateniinin hajottamista. Siinä PKAc-käsittelyn aikaansaama β -kateniinin fosforyloituminen seriini675- ja seriini552-aminohappotähteistä ei vaikuttanut β -kateniinin määrään verrattuna inaktivoituun β -kateniiniin (Ser552A/Ser675A, Ser552A ja Ser675A) HEK293-soluissa. Yhteenvetona voidaan sanoa, että β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä todennäköisesti vähentää β -kateniinin hajottamista ehkäisemällä ubikitiinien sitoutumista β -kateniiniin.

Jonkin verran näyttöä on saatu siitä, että β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä edistää β -kateniinin siirtymistä tumaan. Hino ym. (2005) tutkimuksessa dibutyryyli-syklinen adenosinimonofosfaatti-käsittely (Bt_2cAMP) sai aikaan β -kateniinin fosforyloitumisen seriini675-aminohappotähteestä sekä β -kateniinin kerääntymisen sytosoliin ja tumaan HEK293-soluissa. Näyttö on kuitenkin epäsuoraa, sillä tutkimuksessa β -kateniinin sijoittumista tumaan mitattiin ainoastaan kokonais- β -kateniinin määrällä eikä fosfo-Ser675- β -kateniinin määrällä. Sen sijaan Taurinin ym. (2006) tutkimuksessa forskoliinikäsittelyn aikaansaama

β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä ei vaikuttanut β -kateniinin sijaintiin COS7-solussa verrattaessa toimimattomaan ja toimivaan β -kateniiniin (Ser675A/Ser552A, Ser675A ja Ser552). Tulosta tukee myös Zhun ym. (2012) tutkimus, jossa immunofluoresenssivärjäyskuvista havaittiin, ettei inaktivoituneen β -kateniinin (Ser675A), aktivoituneen β -kateniinin (Ser675D) ja kokonais- β -kateniinin sijainti solussa eronnut toisistaan SW480-soluissa. Näiden tulosten perusteella voidaan ajatella, ettei β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä edistä β -kateniinin siirtymistä tumaan, vaikka viitteitä siitä saatiin Hinon ym. (2005) tutkimuksessa. Siinä β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä saatiin aikaan proteiinkinaasi A -signaalireitin (PKA) aktivaation avulla. Voi olla, että heidän tutkimuksessaan havaittu β -kateniinin lisääntynyt siirtyminen tumaan johtuu β -kateniinin fosforyloitumisella seriini552-aminohappotähteestä (Fang ym. 2007, Lee ym. 2010), sillä vuosi Hinon ym. (2005) tutkimuksen julkaisemisesta Taurin ym. (2006) julkaisi tutkimuksen, jonka mukaan PKA-signaalireitin aktivoituminen saa aikaan β -kateniinin fosforyloitumisen seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä.

Taurinin ym. (2006) tutkimuksessa fosfaattiryhmän liittyminen β -kateniinin seriini675-aminohappotähteeseen edisti β -kateniinin sitoutumista geenien ilmentymistä säätelevään koaktivaattori CBP:hen COS7- ja HEK293-solulinjassa. CBP edistää geenien ilmentymistä asetyloimalla transkriptiotekijöitä (Taurin ym. 2006). Voidaan siis ajatella, että fosfo-Ser675- β -kateniini edistää geenien ilmentymistä vuorovaikuttamalla koaktivaattori CBP:n kanssa.

β -kateniinin seriini552- ja seriini675-aminohappotähteiden fosforylaation lisäksi muiden seriinitähteiden fosforyloituminen saattaa lisätä β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä (Wu ym. 2008, Park ym. 2012). Wun ym. (2008) tutkimuksessa fosfaattiryhmän liittyminen β -kateniinin seriini191- ja seriini605-aminohappotähteisiin edisti β -kateniinin siirtymistä tumaan ST-2-soluissa. Parkin ym. (2012) tutkimuksessa β -kateniinin fosforyloituminen seriini663- ja seriini675-aminohappotähteistä lisäsi β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä useissa ihmisen paksusuolisyövän solulinjoissa. Tutkimuksessa kaikki β -kateniinin aktiiviset muodot (Ser675D, Ser663D/675D ja Ser663D) lisäsivät yhtä paljon TCF/LEF-välitteistä geenien ilmentymistä.

Vaikka tutkimuksissa on saatu vahvaa tutkimusnäyttöä siitä, että β -kateniinin seriinitähteiden fosforyloituminen edistää geenien ilmentymistä, tutkijat kiistelevät tavoista, joilla se edistää sitä. Näyttäisi siltä, että β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä ehkäisee β -kateniinin hajottamista estämällä ubikitiiniryhmän liittymisen β -kateniiniin. Ubikitiiniryhmän liittäminen β -kateniiniin johtaa β -kateniinin siirtymiseen proteasomiin hajotettavaksi. β -kateniinin

hajottamisen estäminen lisää β -kateniinin määrää sytosolissa, joka mahdollistaa β -kateniinin siirtymisen tumaan. Tumassa fosfo-Ser675- β -kateniini saattaa edistää geenien ilmenemistä vuorovaikuttamalla koaktivaattorina toimivan CBP:n kanssa. β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä näyttäisi edistävän β -kateniinin siirtymistä sytosolista tumaan mahdollisesti 14-3-3 ζ -proteiinin avustuksella. Lisäksi on mahdollista, että fosfo-Ser552- β -kateniini rekrytoi tekijöitä, jotka irrottavat fosfo-Ser552- β -kateniinia soluliitoksista. β -kateniinin fosforyloituminen seriini191- ja seriini605-aminohappotähteistä voi edistää β -kateniinin siirtymistä tumaan sekä β -kateniinin fosforyloituminen seriini663-aminohappotähteestä lisätä β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä. Tulosten ristiriitoja voi selittää tutkimuksessa käytetyt erilaiset solutyypit ja tutkimusmenetelmät sekä erot tutkimuksen aikana soluissa vallitsevissa signaalireiteissä.

2.2.4 N-terminaalisen pään fosforylaatio

Alun perin tutkijat ovat havainneet β -kateniinin N-terminaalisen pään fosforyloitumisen johtavan β -kateniinin hajottamiseen (Liu ym. 2002). Viimeaikaisten tutkimusten mukaan N-terminaalisesta päästä fosforyloidulla β -kateniinilla on hajottamisen lisäksi muita tehtäviä solussa ja sen toiminta riippuu mm. signaalireitistä, β -kateniinin sijainnista solussa ja solutyypistä (Sadot ym. 2002, Cho ym. 2011).

Näyttää siltä, että fosfo-Ser45- β -kateniini osallistuu soluliitoksiin ja Wnt-reittiin. Fosfo-Ser45- β -kateniini kykenee olemaan osana soluliitosta, sillä Medrekin ym. (2009) tutkimuksessa Wnt5a-reitin (engl. Wingless 5a) aikaansaama β -kateniinin fosforyloituminen seriini45-aminohappotähteestä lisäsi β -kateniinin sitoutumista E-kadheriiniin ihmisen rinnan epiteelisoluissa. Fosfo-Ser45- β -kateniini voi myös osallistua Wnt-reittiin, sillä Maherin ym. (2010) tutkimuksessa fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniinista suurin osa oli sijoittunut tumaan SW480-soluissa. Fosfo-Ser45- β -kateniinin osallistumista Wnt-reittiin tukee Luckertin ym. (2011) tutkimus, jossa Wnt3a -käsittely (engl. Wingless 3a) lisäsi β -kateniinin fosforyloitumista seriini45-, seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä ja edisti β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä HEK293-solussa. Näiden tulosten perusteella voidaan siis sanoa, että fosfo-Ser45- β -kateniini kykenee sitoutumaan soluliitoksiin ja osallistumaan Wnt-reittiin.

Fosfo-Ser37/33/Thr41- β -kateniini ei todennäköisesti kykene sitoutumaan E-kadheriiniin tai toimimaan Wnt-reitissä. Maherin ym. (2010) tutkimuksessa fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniini ei sitoutunut E-kadheriiniin. Sadotin ym. (2002) tutkimuksessa seriini33- ja seriini37-aminohappotähteistä fosforyloitu β -kateniini ei kyennyt toimimaan Wnt-reitin koaktivaattorina ja osana soluliitoksia paksusuolisyövän SW480-solulinjassa. Staaln ym. (2002) tutkimuksessa fosfaattiryhmän liittyminen seriini33-aminohappotähteeseen ehkäisi β -kateniinia osallistumista Wnt-reittiin CHO-soluissa (engl. chinese hamster ovary cell). Näyttäisi siis siltä, ettei fosfo-Ser37/33/Thr41- β -kateniini osallistu soluliitoksiin tai Wnt-reittiin.

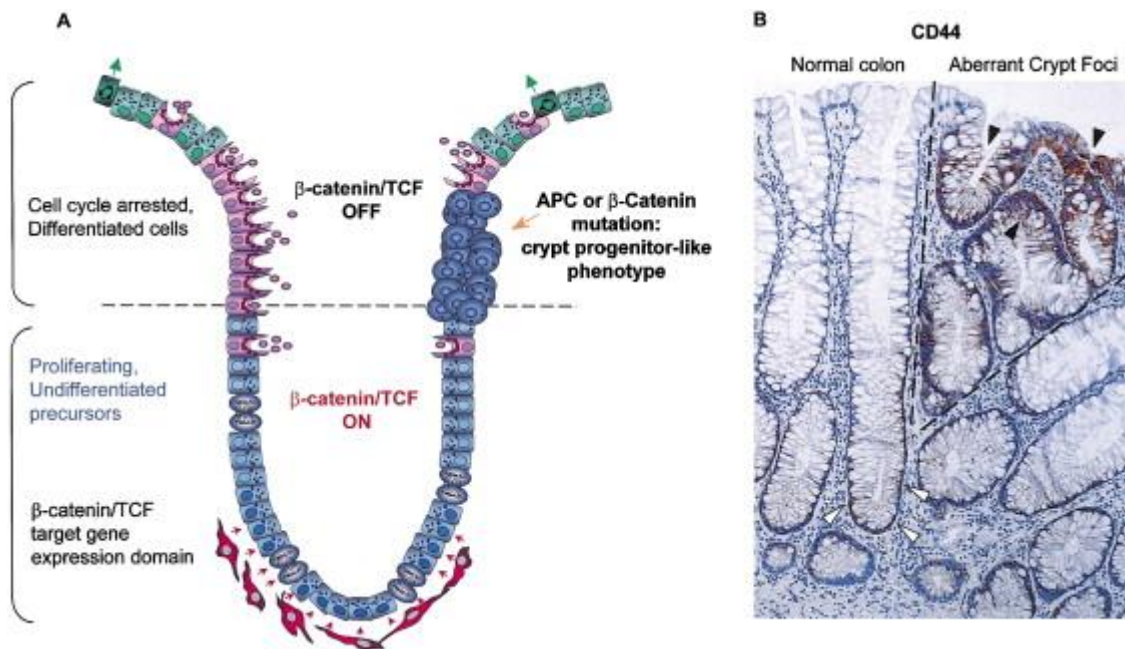
Fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniini sen sijaan näyttäisi osallistuvan solusykliin ja sitoutuvan solun ulokkeiden (engl. cell protrusion) mikrotubuluksiin ja fosforyloituun APC:hen. Tutkimukset viittaavat, että fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniini osallistuu solusykliin vuorovaikuttamalla tuman sukkularihmaston kanssa (Huang ym. 2007, Bahmanyar ym. 2010). Lisäksi Harris ja Nelson (2010) havaitsivat fosfo-Ser33/37/Thr41/Ser45- β -kateniinin sitoutuneen fosfo-Ser33/37/Thr41/Ser45-APC:hen ja mikrotubuluksiin solun ulokkeessa endoteelisoluissa. Solun ulokkeessa sijaitseva fosfo-APC osallistuu ilmeisesti solun migraatioon Wnt-reitistä riippumattomalla tavalla (Harris & Nelson 2010). β -kateniinin merkitystä solun ulokkeessa ei vielä tunneta.

Tutkijat ovat pitkään tienneet β -kateniinin fosforyloitumisen ensin seriini45-aminohappotähteestä ja sen jälkeen seriini33-, ja seriini37- ja treoniini41-aminohappotähteistä johtavan β -kateniinin hajottamiseen (ks. MacDonald ym. 2009). Nykyisen tietämyksen mukaan näillä β -kateniinin fosforylaatiostatuksilla on β -kateniinin hajottamisen lisäksi muita vaikutuksia β -kateniinin toiminnalle. Fosfo-Ser45- β -kateniini todennäköisesti pystyy olemaan osana soluliitoksia ja osallistumaan Wnt-reittiin, kun taas fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniini ei kykene sitoutumaan soluliitoksiin tai edistämään β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä. Tutkijat ovat havainneet fosfo-Ser33/37/Thr41/Ser45- β -kateniinin sitoutuvan fosfo-Ser33/37/Thr41/Ser45-APC:hen ja mikrotubuluksiin solun ulokkeessa. Lisäksi fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniini näyttäisi säätelevän solusykliä tumassa.

2.3 β -kateniini paksusuolisyövässä

Paksusuolisyövän kehittymisen käynnistävät mutaatiot, jotka aiheuttavat muutoksia mm. solujen jakautumista, kasvua ja apoptoosia säätelevissä tekijöissä (ks. Vries ym. 2010). Lukuisat tutkimukset osoittavat, että mutaatiot Wnt-reittiä säätelevissä tekijöissä aloittavat suolistosyövän kehittymisen sekä ihmisillä että hiirillä (ks. Radtke & Clevers 2005). Yleisin Wnt-reitin toimintaan vaikuttava mutaatio on APC-geenimutaatio, jonka seurauksena β -kateniinin hajottamisen säätely häiriintyy (ks. Radtke & Clevers 2005). β -kateniinia kerääntyy sytosoliin, mikä mahdollistaa β -kateniinin siirtymisen tumaan aktivoimaan proto-onkogeenien ilmentymistä. Tätä tukee se, että 80 %:lla paksusuolisyöpään sairastuneista on APC-geenimutaatio ja ainakin 70 %:lla β -kateniinin kohdegeenien ilmentyminen on häiriintynyt (ks. Polakis 2000, Rowan ym. 2000, Lustig & Behrens 2003). Muita β -kateniinin määrää lisääviä mutaatioita tapahtuu geeneissä, jotka ilmentävät mm. β -kateniinin N-terminaalista päätä ja armadilloa sekä aksiinia ja β -kateniinin hajottamiseen osallistuvia entsyymejä (ks. Reya & Clevers 2005, Daugherty & Gottardi 2007, Wu ym. 2008, Maher ym. 2010). Nämä mutaatiot ovat kuitenkin selvästi harvinaisempia kuin APC-mutaatio.

Nykyisen käsityksen mukaan suolistosyövän kehittyminen alkaa epiteelin kantasoluista (ks. kuva 6, Kong ym. 2011). Kantasoluissa mutaation aikaansaama β -kateniinin säätelyn häiriintyminen edistää TCF4:n kohdegeenien ilmentymistä (van de Wetering ym. 2002). β -kateniini edistää solujen jakautumista edistäviä (mm. *C-MYC* ja *CCND1*) sekä erilaistumista (mm. *C-MYC*) ja apoptoosia ehkäiseviä (mm. surviviini-proteiinia ilmentävää geeniä) geenejä (van de Wetering ym. 2002, ks. Brabletz ym. 2005). Kantasolut tuottavat viallisia välivahvistinsoluja ja vialliset välivahvistinsolut jakautuvat (ks. Clevers 2006). Suoliston normaaleissa välivahvistinsoluissa tapahtuva Wnt-reitin toiminnan vaimentuminen solujen siirtyessä kohti villusta ei tapahdu viallisissa välivahvistinsoluissa, vaan Wnt-reitti on aktiivinen kryptan ja villuksen soluissa (ks. Clevers 2006, van der Flier & Clevers 2009). Tämä estää välivahvistinsolujen erilaistumisen, sillä Wnt-reitti ehkäisee solujen erilaistumista edistävien geenien ilmentymistä ja välivahvistinsolut jäävät kryptan kaltaisiksi soluiksi (van de Wetering ym. 2002, ks. Clevers 2006). Erilaistumattomat solut eivät käy läpi ohjelmoitua solukuolemaa kuten erilaistuneet solut normaalitilassa (Bedi ym. 1995), koska Wnt-reitti ilmentää apoptoosia ehkäiseviä geenejä (ks. Brabletz ym. 2005). Tämän seurauksena kryptan koko kasvaa, erilaistumattomia soluja kerääntyy villukseen ja ne tunkeutuvat villuksen sisälle, mikä johtaa suolistokasvaimen muodostumiseen (ks. Clevers 2006).

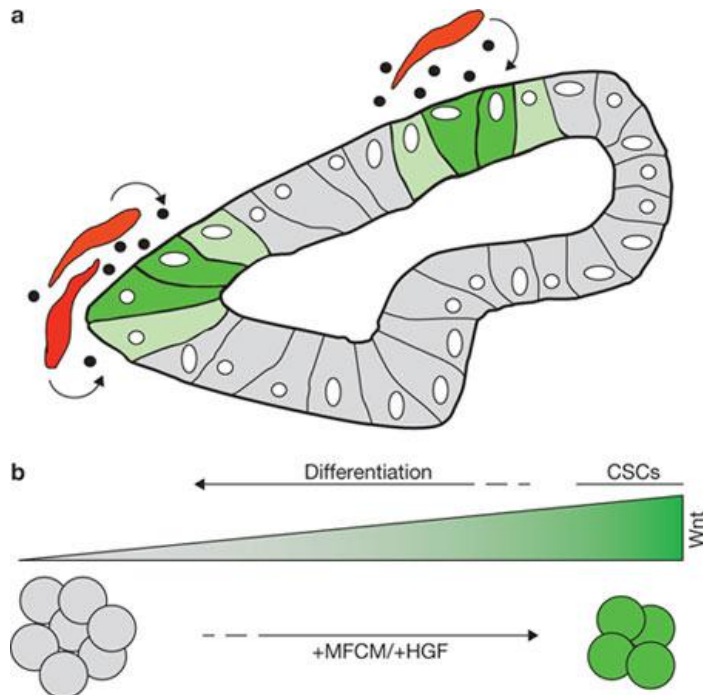


Kuva 6. Wnt-reitin toiminta suolistosyövän esiasteessa (A) Kuva esittää, miten β -kateniinin säätelyn häiriintyminen johtaa suolistosyövän esiasteeseen. (B) β -kateniinin kohdegeenin CD44:n aktiivisuus normaalissa ja normaalista poikkeavissa kryptissa (engl. Aberrant Crypt Foci). Normaalissa pakasusuolessa CD44:tä ilmennetään kuvassa valkoisilla nuolilla osoittamassa kryptan pohjalla. Normaalista poikkeavissa kryptissa CD44:ä ilmennetään kuvassa mustien nuolien osoittamissa suoliston epiteelin pinnoilla (van de Wetering ym. 2002).

Wnt-reitin toiminnan vuoksi erilaistumattomat solut eivät kykene käymään läpi ohjelmoitua solukuolemaa, jonka vuoksi suolistokasvain säilyy monta vuotta (Bedi ym. 1995, ks. Clevers 2006). Tämä mahdollistaa uusien mutaatioiden muodostumisen. Suolistokasvaimen etenemistä karsinoomaksi vauhdittavat mutaatiot onko- ja tuumorisuppressorigeeneissä kuten *K-Ras:ssa*, *p53:ssa* ja *Smad4:ssä* (ks. Reya & Clevers 2005, Sipos & Galamb 2012). Nämä geenimutaatiot voimistavat Wnt-reitin toimintaa entisestään (Vermeulen ym. 2010). Fodden ym. (2001) mukaan syövän kehittymiseen tarvitaan ainakin neljä geenimutaatiota.

Mutaatioiden lisäksi solun ulkoiset tekijät säätelevät ja ylläpitävät paksusuolisyövän kantasolujen ja niiden läheisyydessä olevien paksusuolisyöpäsolujen toimintaa (ks. kuva 7, Vermeulen ym. 2010). Kantasolujen läheisyydessä sijaitsevat strooman myofibroblastit ja mesenkyymisolut erittävät Wnt-reittiä edistäviä tekijöitä kuten kasvutekijöitä ja sytokiineja, jotka aktivoivat syöpäkantasoluja ja läheisiä syöpäsoluja (ks. Fodde & Brabletz 2007). Vermeulenin ym. (2010) tutkimuksessa paksusuolisyövän kantasolujen viljeleminen myofibroblastien kanssa lisäsi β -kateniinin siirtymistä tumaan ja Wnt-reitin toimintaa. Kantasoluissa syövän kehittyminen saattaakin olla dynaaminen

tapahtumasarja, jossa solunulkoiset tekijät edistävät syöpäkudoksen reunalla olevien kantasolujen kykyä lisätä Wnt-reitin toimintaa ja sen avulla mahdollistavat syövän leviämisen (Vermeulen ym. 2010).

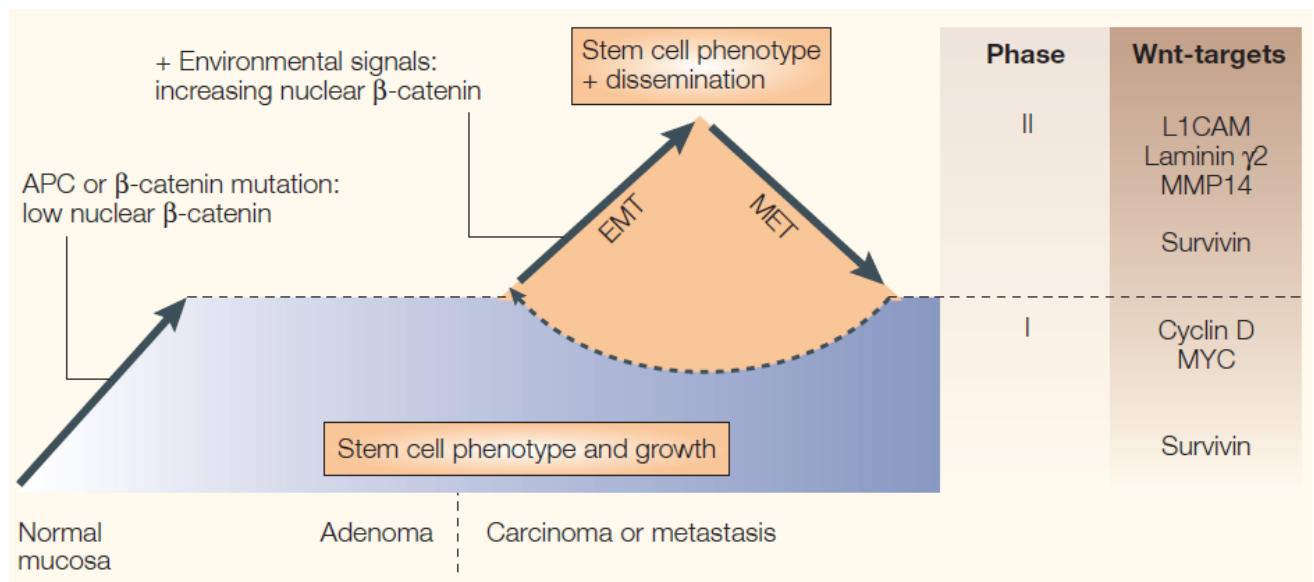


Kuva 7. Wnt-reitin toiminta paksusuolisyövän kudoksissa. (a) Vihreällä kuvatuissa syöpäsoluissa Wnt-reitti on aktiivinen. Nämä solut sijaitsevat lähellä punaisella kuvattuja myofibroblasteja. Harmaalla kuvatuissa syöpäsoluissa Wnt-reitin aktiivisuus on pieni. (b) Malli kuvaa Wnt-reitin aktiivisuutta paksusuolisyöpäsoluissa. Mitä erilaistuneemmasta syöpäsolusta on kyse, sitä vähäisempää on Wnt-reitin toiminta. Paksusuolisyövän kantasoluilla (CSCs) Wnt-reitin toiminta on suurinta. Solun ulkoiset tekijät kuten myofibroblastien (MFCM) erittämät hepatosyyttikasvutekijät (HGF) lisäävät Wnt-reitin toimintaa. Myofibroblastit sijaitsevat syöpäkudoksen reunoilla lähellä paksusuolisyövän kantasoluja (Vermeulen ym. 2010).

Karsinooma muuttuu invasiiviseksi paksusuolisyöväksi, kun syöpäsolut eivät enää ilmennä epiteelisoluille tyypillisiä merkkiaineita solunpinnalla, vaan sen sijaan ne ilmentävät solujen liikkuvuutta edistäviä merkkiaineita (ks. Brabletz ym. 2005). Tätä muutosta kutsutaan ns. epiteeli-mesenkyyymi –muutosprosessiksi (engl. epithelial-to-mesenchymal transition, EMT), jossa syöpäsolut muuttuvat kantasolun kaltaisiksi syöpäsoluiksi (Kong ym. 2011). Tämä tapahtuu, kun geenimutaatiot ja solun ulkoiset tekijät tehostavat Wnt-reitin toimintaa entisestään ja tuman β -kateniinipitoisuus saavuttaa tietyn kynnsarvon (ks. Brabletz ym. 2005, Vermeulen ym. 2010). Muutosprosessissa β -kateniini irtaantuu soluliitoksista ja se siirtyy tumaan edistämään geenien ilmentymistä (ks. Brabletz ym. 2005). Tumassa β -kateniini edistää solujen liikkuvuutta lisäävien

geenien (mm. *L1CAM* ja *LAMC2*) ja soluliitosten muodostumista ehkäisevien geenien (mm. soluliitosten E-kadheriinia ilmentävä *SLUG*) ilmentymistä (ks. Brabletz ym. 2005). Sen seurauksena soluliitokset hajoavat ja solun tukirangan rakenne muuttuu. Suolistosyövän kantasolut kykenevät irrottautumaan syöpäkudoksesta ja muodostamaan etäpesäkkeitä. Kiinnittyessään uuteen alustaan suolistosyövän kaltaiset kantasolut kykenevät muuttumaan takaisin epiteelisolun kaltaisiksi soluiksi ilmentämällä sille ominaisia solunpinnan proteiineja, jolloin solu käy läpi mesenkyymi-epiteeli - muutosprosessin (engl. mesenchymal-to-epithelial transition, MET, ks. Brabletz ym. 2005). Tämän vaikutuksesta β -kateniinin määrä tumassa vähenee ja β -kateniinia sitoutuu soluliitoksiin.

β -kateniinin säätelyn häiriytyminen vaikuttaa paksusuolisyövän esiasteen kehittymiseen (1), sen etenemiseen karsinoomaksi (2) ja invasiiviseksi syöväksi (3). (1) APC:ä tai β -kateniinia säätelevän geenin mutaatio johtaa suolistokasvaimen muodostumiseen, sillä β -kateniinin hajottamisen säätely häiriintyy (ks. kuva 8). Tämä mahdollistaa β -kateniinin siirtymisen tumaan edistämään solun jakautumista lisäävien sekä solun erilaistumista ja apoptoosia ehkäisevien geenien ilmentymistä. Sen seurauksena villuksessa sijaitsevat välivahvistinsolut jäävät kryptan kaltaisiksi erilaistumattomiksi soluiksi, jotka eivät käy läpi ohjelmoitua solukuolemaa. Kryptan koko kasvaa ja erilaistumattomia soluja kerääntyy villukseen, mikä johtaa suolistokasvaimen kehittymiseen. (2) Suolistokasvain muuttuu karsinoomaksi, kun lisää Wnt-reittiä edistäviä geenimutaatioita tapahtuu onko- ja tuumorisuppressorigeneeneissä. Lisäksi kantasolujen läheisyydessä sijaitsevat strooman myofibroblastit ja mesenkyymisolut erittävät kasvutekijöitä ja sytokiineja syöpäkantasoluihin ja läheisiin syöpäsoluihin, jotka tehostavat Wnt-reitin toimintaa syöpäkasvaimen reunoilla. (3) Karsinooma pystyy lähettämään etäpesäkkeitä, kun β -kateniinia siirtyy soluliitoksista tumaan ja tuman β -kateniinipitoisuus saavuttaa tietyn kynnyksarvon. Sen seurauksena β -kateniini lisää solujen liikkuvuutta edistävien ja soluliitosten muodostumista ehkäisevien geenien ilmentymistä. Näin kantasolun kaltaiset syöpäsolut kykenevät irtautumaan syöpäkudoksesta. Kiinnittyessään uuteen alustaan suolistosyövän kaltaiset kantasolut kykenevät muuttumaan takaisin epiteelisolun kaltaisiksi soluiksi, jonka seurauksena β -kateniinin määrä tumassa vähenee ja β -kateniinia sitoutuu soluliitoksiin.



Kuva 8. β-kateniinin vaikutus suolistokasvaimen muodostumiseen ja sen etenemiseen karsinoomaksi ja invasiiviseksi syöväksi (Brabletz ym. 2005).

2.3.1 β-kateniinin fosforylaatio paksusuolisyövän kehittämisessä

Viimeaikaisten tutkimusten mukaan APC-mutaatio ehkäisee β-kateniinin hajottamista, mutta ei lisää β-kateniinin siirtymistä tumaan (Phelps ym. 2009). Jotta β-kateniini kykenee lisäämään paksusuolisyöpää edistävää hallitsematonta geenien ilmentymistä, muita muutoksia täytyy tapahtua β-kateniinissa ja sen kanssa vuorovaikutuksessa olevissa tekijöissä. Syöpätutkijat ovatkin kiinnostuneet β-kateniinin translaation jälkeisestä muokkaamisesta kuten fosforylaatiosta. Goentoron ja Kirschnerin (2009) mukaan geenien ilmentymisen kannalta β-kateniinin konformaatiomuutos on tärkeämpi tekijä kuin β-kateniinipitoisuus. Translaation jälkeisen muokkaamisen avulla voidaan edistää β-kateniinin kohdegeenien ilmentymistä, vaikka β-kateniinipitoisuus olisi pieni (ks. Clevers & Nusse 2012).

2.3.1.1 Fosfo- β -kateniinin merkitys Wnt-reitissä

β -kateniinin fosforyloituminen saattaa edistää suolistosyövän kehittymistä ja etenemistä lisäämällä proto-onkogeenien ilmentymistä, ehkäisemällä β -kateniinin hajottamista ja edistämällä β -kateniinin siirtymistä tumaan (ks. Harris & Peifer 2005, Fang ym. 2007, Zhu ym. 2012). β -kateniinin hajottamisen vähentyminen lisää sytosolissa vapaana olevaa β -kateniinin määrää, mikä mahdollistaa β -kateniinin siirtymisen tumaan. β -kateniinin siirtyminen tumaan edistää proto-onkogeenien ilmentymistä, koska tumassa β -kateniini aktivoi geenien ilmentymiseen osallistuvia transkriptiotekijöitä ja koaktivaattoreita.

β -kateniinin fosforylaatio vaikuttaa myös siihen, mitä geenejä ilmennetään (ks. Daugherty & Gottardi 2007). Käsitystä tukevat tutkimukset, joissa β -kateniinin fosforyloituminen on lisännyt β -kateniinin vuorovaikutusta geenien koaktivaattoreiden kanssa (Piedra ym. 2001, Taurin ym. 2006). Miyabayashi ym. (2007) havaitsivat, että β -kateniini/CBP-välitteinen transkriptio lisäsi solujen jakautumista sikiön kantasoluissa ja β -kateniini/p300-välitteinen transkriptio edisti solujen erilaistumista. Tämä on tärkeää paksusuolisyövän kehittämisessä, sillä paksusuolisyöpäsoluissa jakautumista ja kantasolun fenotyyppiä ylläpitävien geenien ilmentyminen on lisääntynyt, kun taas erilaistumista ja apoptoosia edistävien geenien ilmentyminen on vähentynyt (ks. Bienz & Clevers 2000, Brabletz ym. 2005, Clevers & Nusse 2012). Nämä muutokset geenien ilmentymisessä saavat aikaan paksusuolisyöpäsolujen hallitsemattoman jakautumisen, suoliston epiteelisolujen kerääntymisen kryptaan ja vähentyneen ohjelmoidun solukuoleman (Bedi ym. 1995, ks. Clevers 2006). Tämä muuttaa suoliston epiteelin rakennetta ja edistää paksusuolisyöpää edistävien mutaatioiden syntyä (ks. Clevers 2006, Reya & Clevers 2005, Sipos & Galamb 2012).

β -kateniinin fosforyloituminen voi myös edesauttaa syövän etenemistä invasiiviseksi syöväksi edistämällä β -kateniinin irtoamista soluliitoksista (Piedra ym. 2003, Brembeck ym. 2004). β -kateniinin fosforylaation aikaansaama β -kateniinin irtoaminen solukalvolta saa aikaan soluliitosten hajoamisen, epiteelisolujen merkkiaineen E-kadheriinin irtoamisen solukalvolta ja solun tukirangan muuttumisen (Huber ym. 2001, Bek & Kemler 2002). Muutokset edistävät epiteelisolujen muuttumista etäpesäkkeitä muodostaviksi kantasolun kaltaisiksi syöpäsoluiksi (Brembeck ym. 2004).

2.3.1.2 Fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniini solusyklin säätelijänä

β -kateniinin kyky säädellä solusykliä saattaa myös vaikuttaa syövän syntyyn (Huang ym. 2007). Tutkimuksessa sentrosomin rakenne ja mikrotubulusten sitoutuminen toisiinsa häiriintyi, kun β -kateniinin fosforylaatio seriini33-, seriini37- ja treoniini41-aminohappotähteistä estettiin S33A-mutaation avulla COS7-soluissa (Huang ym. 2007). Bahmanyarin ym. tutkimuksessa (2010) taas N-terminaalista päästä manipuloidun β -kateniinin kerääntyminen soluun sai aikaan vääränlaisen sentrosomin rakenteen normaaleissa epiteelisoluissa. Samassa tutkimuksessa havaittiin, että manipuloitua β -kateniinia tarvittiin ylläpitämään poikkeavaa sentrosomin rakennetta paksusuolisyöpäsoluissa. Huangin ym. (2007) tutkimuksessa havaittiin, että seriini33-aminohappotähteeltään toimimattoman β -kateniinin liiallinen tuottaminen häiritsi mikrotubulusten järjestäytymistä, ehkäisi tumasukkulan kasvua ja aiheutti epänormaalin tuman muodostumisen (engl. abnormal nucleus). Myös suuri määrä aktiivista β -kateniinia (S33E/37E/T41E) häiritsi mikrotubulusten oikeanlaisen rakenteen muodostumista ja sai aikaan poikkeavan tumarakenteen osassa COS7-soluista (Huang ym. 2007). Tutkimukset viittaavat siihen, että β -kateniinin N-terminaalisen päään fosforylaation häiriintyminen saattaa edistää suolistosyöpää muuttamalla sentrosomin rakennetta ja mikrotubulusten järjestäytymistä. Häiriöt sentrosomin rakenteessa lisäävät genomien epävakautta, mikä puolestaan edistää syövän syntyä (Huang ym. 2007).

2.3.1.3 Signaalireitit β -kateniinin fosforylaation säätelijänä

Wnt-reitin lisäksi monet muut solun signaalireitit säätelevät β -kateniinin toimintaa: Ensinnäkin ne voivat fosforyloidu yhden tai useamman β -kateniinin aminohappotähteen samanaikaisesti. Toiseksi ne säätelevät β -kateniinin kanssa vuorovaikuttavien kohdeproteiinien määrää tai aktiivisuutta.

Paksusuolisyövän kehittymiseen ja sen etenemiseen osallistuvat solun ulkoiset viestimolekyylit, jotka sitoutuvat solukalvoilla oleviin reseptoreihin kuten EGFR:ään (engl. epidermal growth factor receptor, Ringerike ym. 2002, Civenni ym. 2003). Nämä reseptorit aktivoivat monia signaalireittejä kuten ERK- (engl. extracellular-signal-regulated kinases), PAK1- (engl. P21 protein-activated kinase 1) ja PI3K (engl. phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt-reittejä, jotka puolestaan säätelevät β -kateniinin toimintaa (Fang ym. 2007, Sun 2009, Zhu ym. 2012). PAK1- ja ERK-reitit aktivoivat β -kateniinia fosforyloimalla sen seriini675-aminohappotähteen (Sun 2009, Zhu ym. 2012). Akt-reitti edistää Wnt-reittiä fosforyloimalla β -kateniinin seriini552-aminohappotähteestä ja lisäämällä β -kateniinin määrää ehkäisemällä GSK3 β :n toimintaa (Fang ym. 2007). β -kateniini osallistuu paksusuolisyövän kehittymiseen ja sen etenemiseen edistämällä proto-onkogeenien ilmentymistä.

2.3.1.4 Ravinnon vaikutus β -kateniinin fosforylaatioon

Ravintotekijöiden vaikutusta β -kateniinin fosforylaatioon ei ole juurikaan tutkittu. Sen sijaan ravinnon vaikutusta kokonais- β -kateniiniin on tutkittu enemmän (ks. taulukko 3). Tutkimukset ovat pääosin hiiri- ja solututkimuksia, vaikka ravinnon vaikutusta β -kateniiniin on myös tutkittu ihmisten suolistokasvaimien näytteistä. Tutkimuksissa on tutkittu yhden tai useamman ravintotekijän vaikutusta suolistosyövän kehittymiseen ja sen etenemiseen, β -kateniinin määrään, sen sijoittumiseen solussa ja β -kateniinin kohdegeenien ilmentymiseen.

Taulukko 3. Ravintotekijöiden vaikutus paksusuolisyövän kehittymiseen, β -kateniinin määrään ja β -kateniinin kohdegeenien ilmentymiseen

Tutkimus	Malli	Ravintotekijä	Kontrolli	Vaikutus paksusuolisyövän kehittymiseen	β -kateniini	β -kateniinin kohdegeenit
Tang ym. 2012	ksenografti-hiirimalli, HT-29-solut	45 E% maissiöljy	13,5 E% maissiöljy	↑ kasvaimien koko, ↑ syövän eteneminen	↑ tuman	↑
Fujise ym. 2007	Sprague-Dawley uroshiiret, AOM	10 % naudan tali (SFA)	Kontrollidieetti ¹	↑ suoliston rakennemuutokset, ↑ kasvaimien insidenssi ja määrä	↑ sytosolin	↑
	Sprague-Dawley uroshiiret, AOM	10 % maissiöljy (n-6 PUFA)	Kontrollidieetti ¹	↑ suoliston rakennemuutokset, ↑ kasvaimien insidenssi ja määrä	↑ sytosolin	↑
	Sprague-Dawley uroshiiret, AOM	10 % oliiviöljy (MUFA)	Kontrollidieetti ¹	↓ suoliston rakennemuutokset, ↓ kasvaimien insidenssi ja määrä	—	—
	Sprague-Dawley uroshiiret, AOM	10 % kalaöljy (PUFA)	Kontrollidieetti ¹	↓ suoliston rakennemuutokset, ↓ kasvaimien insidenssi ja määrä	—	—
Bose ym. 2007	<i>Apc</i> ^{Min} -hiiret	12 % kalaöljy, 8 % rasvasekoite (amerikkalainen dieetti)	20 % rasvasekoite (amerikkalainen dieetti)	— Kasvaimien määrä ja koko	↓	*
Fini ym. 2010	<i>Apc</i> ^{Min} -hiiret	5 % EPA-FFA, 2 % soijaöljy	7 % soijaöljy	↓ kasvaimien määrä ja koko, ↓ solujen jakautuminen, ↑ apoptoosi	↓ tuman	*
	<i>Apc</i> ^{Min} -hiiret	2,5 % EPA-FFA, 4,5 % soijaöljy	7 % soijaöljy	↓ kasvaimien määrä ja koko, ↓ solujen jakautuminen, ↑ apoptoosi	↓ tuman	*
Umar ym. 2003	Helicobacter-free Swiss-Webster –hiiret, <i>Citrobacter rodentium</i>	1,0 % kalsium	0,5 % kalsium	↓ kryptan pituus, ↓ solujen jakautuminen	—	—

Tutkimus	Malli	Ravintotekijä	Kontrolli	Vaikutus paksusuolisyövän kehittymiseen	β-kateniini	β-kateniinin kohdegeenit
Yang ym. 2008	C57Bl/6-hiiri	Länsimainen dieetti ³ , D ₃ - vitamiinia 2,3 IU/g, kalsiumia 7,0 mg	Länsimainen dieetti ² , D ₃ - vitamiinia 0,11 IU/g, kalsiumia 0,5 mg/g	↓ kasvaimien insidenssi	↓	—
	C57Bl/6-hiiri	Länsimainen dieetti ³ , folaattia 2,3 µg/g	Länsimainen dieetti ² , folaattia 0,23 µg/g	— kasvaimien insidenssi	—	—
	C57Bl/6-hiiri	Länsimainen dieetti ³ , koliinia 0,24 %	Länsimainen dieetti ² , koliinia 0,12 %	— kasvaimien insidenssi	—	—
	C57Bl/6-hiiri	Länsimainen dieetti ³ , metioniinia 0,36 %	Länsimainen dieetti ² , metioniinia 0 %	— kasvaimien insidenssi	—	—
	C57Bl/6-hiiri	Länsimainen dieetti ³ , selluloosaa 6 %	Länsimainen dieetti ² , selluloosaa 2 %	— kasvaimien insidenssi	—	—
Pálmer ym. 2001	SW480-ADH-solut	10-7 M kalsitrioli	*	↓ syövän eteneminen, ↑ solujen erilaistuminen	↑ solukalvon, ↓ tuman	↓
Rey ym. 2012	NCMiCaSR kalsiumreseptoria ilmentävät – solut, kalsiumreseptoria ilmentävät <i>Casr</i> hiiret	soluilla: 5 mM kalsium soluilla	NiMiCaSR kalsiumreseptoria ilmentämättömät –solut, suolistossa kalsiumreseptoria ilmentämättömät <i>Casr</i> KO hiiret	hiirillä: ↓ kryptan pituus, ↓ solujen jakautuminen	soluilla: ↑ solukalvon, hiirillä: ↓ tuman	soluilla: ↓
Chakrabarty ym. 2003	FET-, SW480-, MOSER- ja CBS- paksusuolen syöpäsolut	1 mM kalsium	*	↓ syövän eteneminen, ↑ solujen erilaistuminen	*	↓

Tutkimus	Malli	Ravintotekijä	Kontrolli	Vaikutus paksusuolisyövän kehittymiseen	β-kateniini	β-kateniinin kohdegeenit
Chakrabarty ym. 2005	CBS -paksusuolen syöpäsolut	1 mM kalsium	*	↓ solujen jakautuminen ↑ solujen erilaistuminen	*	↓
	CBS -paksusuolen syöpäsolut	0,1 mM kalsitrioli	*	↓ solujen jakautuminen ↑ solujen erilaistuminen	*	—
	CBS -paksusuolen syöpäsolut	1 mM kalsium ja 0,1 mM kalsitrioli	*	↓ solujen jakautuminen ↑ solujen erilaistuminen	*	↓
Jaszewski ym. 2004	Kaksoissokkoutettu interventio, kolorektaalisia adenoomia	5 mg/d folaattilisä	Lumetabletti	*	↓ tuman	*

* Ei mitattu

— Ei vaikutusta

↑ Edistävä vaikutus

↓ Ehkäisevä vaikutus

¹ Kontrollidieetin rasvahappokoostumus: 14.6% palmitiinihappoa, 24.6% öljyhappoa, 46.6% linolihappoa, 3.8% α-linoleenihappoa ja 2.6% steariinihappoa. Kontrolliruoan rasvapitoisuutta ei mainittu tutkimuksessa

² Kontrollidieetti sisälsi 20 % maissiöljyä, 0,5 mg/g kalsiumia, 0,11 IU/g D₃-vitamiinia, 3,6 mg/g fosforia, 0,23 µg/g foolihappoa, 0 % metioniinia, 0,12 % koliinibitartraattia, 2 % selluloosaa, 0,3 % L-kysteiiniä.

³ Tutkimusdieetit olivat koostumukseltaan kontrolliruoan kanssa samanlaisia paitsi tutkittavan ravintotekijän suhteen.

3 Pro gradu -tutkielman tavoite

β -kateniini on keskeinen paksusuolisyövän proto-onkogeeni. Viime vuosina tutkijat ovat havainneet, että β -kateniinin fosforyloituminen vaikuttaa sen kykyyn edistää paksusuolisyöpää. Pro gradu -tutkielman tavoitteena oli kehittää western blotting -menetelmää fosfo- β -kateniinipitoisuuksien määrittämiseksi Odyssey infrared imager -laitteella. Odyssey infrared imager -laite on uudenaikaiseen fluoresenssiteknologiaan perustuva kuvantamislaitte, joka on herkempi proteiinipitoisuuksien määrittämiseen kuin aiemmin Helsingin yliopiston ravitsemustieteen osastolla käytetty kemiluminesenssiin pohjautuva menetelmä. Tavoitteena oli kehittää määrittämenetelmä fosfo-Thr41/Ser45-, fosfo-Ser33/37/Thr41-, fosfo-Ser552-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Tyr654- β -kateniinin määrittämiseksi hyödyntäen Apc^{Min}-hiirien ohutsuolen limakalvonäytteitä ja ihmisen HT29- ja HCA7-paksusuolisyövän solunäytteitä.

Menetelmän kehittämisen aikana havaittiin, että fosfo-Ser552- ja fosfo-Ser675- β -kateniinipitoisuudet vaihtelivat huomattavasti Apc^{Min}-hiirinäytteiden välillä. Sen vuoksi β -kateniinin fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä päätettiin analysoida kahdesta Apc^{Min}-hiirillä tehdystä dieettitutkimuksesta. Toisessa oli tutkittu kasvistanolien ja toisessa ns. länsimaisen dieetin vaikutusta suolistokasvaimien kehittymiseen. Länsimaisessa dieetissä oli ravitsemussuosituksiin nähden paljon rasvaa, etenkin tyydyttynyttä rasvaa, sekä niukasti kuitua, D-vitamiinia, kalsiumia ja foolihappoa. Tavoitteena oli nähdä, vaikuttavatko tutkimusdieetit fosfo- β -kateniinin määrään hiirien suoliston limakalvossa. Dieetikokeiden tutkimuskysymys on jaettu kolmeen tarkentavaan kysymykseen, johon pro gradu -tutkielmassa pyritään vastaamaan:

1. Eroaako kokonais- β -kateniinin sekä seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä fosforyloidun β -kateniinin määrä dieettiryhmien välillä?
2. Miten kokonais- β -kateniini sekä seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä fosforyloitu β -kateniini korreloivat suolistokasvaimien keskimääräisen lukumäärän ja koon kanssa?
3. Miten kokonais- β -kateniini sekä seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä fosforyloitu β -kateniini korreloivat muiden suolistosyövän kehittymisen kannalta tärkeiden signaalireittien kanssa?

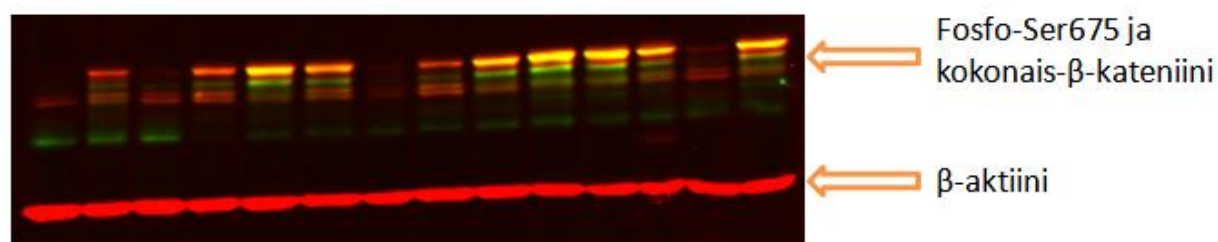
4 Tutkimusmenetelmät ja aineistot

4.1 Western blotting –menetelmä

Pro gradu -tutkielman kokeellisen osuuden ensimmäinen tavoite oli kokeilla Helsingin yliopiston ravitsemustieteen osastolle syksyllä 2011 hankittu uudenlaiseen teknologiaan perustuvan Odyssey infrared imager –laitteen toimivuutta. Laitetta käytetään proteiinin kvantitatiiviseen analysointiin Western blotting –menetelmällä. Kokeellisessa osuudessa testattiin ja kehitettiin edelleen fluoresenssiin pohjautuvaa menetelmää fosforyloituneille β -kateniinin muodoille, joille oli saatavilla kaupallinen vasta-aine. Menetelmän testaaminen aloitettiin tarkistamalla, että laboratoriossa aikaisemmin käytetty fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniinin tunnistaminen toimi edelleen perinteisellä kemiluminesenssiin perustuvalla menetelmällä. Huomattuamme, että fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniinin määrittäminen toimii kemiluminesenssiin pohjautuvalla menetelmällä, siirryimme optimoimaan fosfo-Thr41/Ser45-, fosfo-Ser33/37/Thr41-, fosfo-Ser552-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Tyr654- β -kateniinin määrityolosuhteita Odyssey infrared imager –laitteelle soveltuviksi. Menetelmää kehitettiin hyödyntämällä jo olemassa olevia ihmisen HT29- ja HCA7-paksusuolisyöpäsolujen sekä Apc^{Min}-hiirien näytteitä.

Fluoresenssiin pohjautuvalla menetelmällä saadaan kuvannettua herkemmin tutkittavat proteiinit kuin osastolla aiemmin käytetyllä kemiluminesenssiin perustuvalla menetelmällä (ks. Mathews ym. 2009). Fluoresenssiin pohjautuva kuvantaminen on vakaampi tapa mitata proteiinipitoisuutta kuin valoa tuottavaan entsyymaattiseen reaktioon perustuva kemiluminesenssimenetelmä (ks. Mathews ym. 2009). Tämä johtuu siitä, että kemiluminesenssissa tapahtuva entsyymaattinen reaktio on dynaaminen ja sen tuottama signaali muuttuu ajan myötä. Lisäksi fluoresenssiin perustuvalla menetelmällä voidaan havaita signaaleja laajemmalla aallonpituudella kuin kemiluminesenssiin pohjautuvalla menetelmällä (ks. Mathews ym. 2009). Odyssey infrared imager –laitteella pystytään mittaamaan samanaikaisesti kahta samanaikaisia proteiinia kuten kokonais- β -kateniinia ja sen fosforylaatiomuotoa kuvantamalla toinen proteiini punaisena näkyvällä 700 nm:n aallonpituuden kanavalla ja toinen proteiini vihreänä näkyvällä 800 nm:n aallonpituuden kanavalla (ks. kuva 9, Moore 2013). Tämä parantaa tuloksen luotettavuutta verrattuna kemiluminesenssiin perustuvalla menetelmällä, sillä

kemiluminesenssissa samanpainoisten proteiinien kuvantaminen samanaikaisesti ei ole mahdollista. Kemiluminesenssiin pohjautuvalla menetelmällä kuvannetaan kaksi samanpainoista proteiinia, (a) proteiinit kuvannetaan membraanilta kahdella eri kuvantamiskerralla ja ensimmäisenä kuvannettuun proteiiniin sitoutuneet vasta-aineet irrotetaan proteiinista (engl. stripping) tai (b) näytteet analysoidaan kahdella erillisellä membraanilla. Mitattavan singaalin tuottavien vasta-aineiden irrottaminen proteiinista toisen samanpainoisen proteiinin määrittämiseksi saattaa heikentää toisen mitattavan proteiinin tuloksen luotettavuutta. Tämä johtuu siitä, että menetelmässä ensimmäisenä määritettyyn proteiiniin on saattanut jäädä kiinni signaalin tuottavaa vasta-ainetta, jonka seurauksena mitattu signaali on liian suuri. Toisaalta käsittelyn aikana tutkittavaa proteiinia voi irrota membraanilta, minkä seurauksena mitattu signaali on liian heikko. Kahdelta membraanilta analysoiminen saattaa taas lisätä mittausvirhettä satunnaisvirheen kasvaessa mm. pipetointiepätarkkuuden vuoksi.



Kuva 9. Odyssey infrared imager – laitteella kuvannettu fosfo-Ser675-β-kateniini, kokonais-β-kateniini ja β-aktiini Apc^{Min} -hiiren suoliston limakalvonäytteestä. Kuva on otettu näkymästä, jossa 700 nm:n ja 800 nm:n kanavat ovat samanaikaisesti päällä. Fosfo-Ser675-β-kateniini on mitattu 800 nm aallonpituudella, joka näkyy kuvassa vihreänä. Kokonais-β-kateniini ja β-aktiini on mitattu 700 nm aallonpituudella, joka näkyy kuvassa punaisena.

4.2 Fosfo-β-kateniinin määrittäminen Western blotting -menetelmällä

Western blotting -menetelmällä tunnistetaan proteiineja spesifisesti solulysaatista eristetystä proteiiniseoksesta (ks. Moore 2013). Menetelmällä saadaan semikvantitatiivista tietoa spesifisen proteiinin pitoisuudesta näytteessä. Western blotting -menetelmä koostuu kolmesta vaihteesta: (1) elektroforeesista, jossa proteiinit erotellaan toisistaan molekyylipainon avulla, (2) blottauksesta, jossa proteiinit siirretään geeliltä membraanille ja (3) tunnistamisesta, jossa tutkittava proteiini detektoidaan vasta-aineiden avulla (ks. Moore 2013).

4.2.1 Elektroforeesi

Näytteet laimennettiin näytepuskuriin (1:1). Näytepuskurin glyseroli edistää näytteiden uppoamista geelikaivojen pohjaan ja sen bromofenolisininen värjää näytteet siniseksi, mikä helpottaa pipetoidun näytteen näkemistä kaivoissa (ks. Moore 2013). Puskurin natriumlauryylisulfaatti (SDS) puolestaan rikkoo proteiinin kolmiulotteista rakennetta estämällä aminohappojen välisiä vuorovaikutuksia ja 2-merkaptto-etanoli hajottaa aminohappojen välisiä rikkisilloja (ks. Moore 2013). Näytteiden denaturoituminen eli kolmiulotteisen rakenteen hajoaminen varmistettiin kuumentamalla näytteitä 100 °C:ssa viiden minuutin ajan.

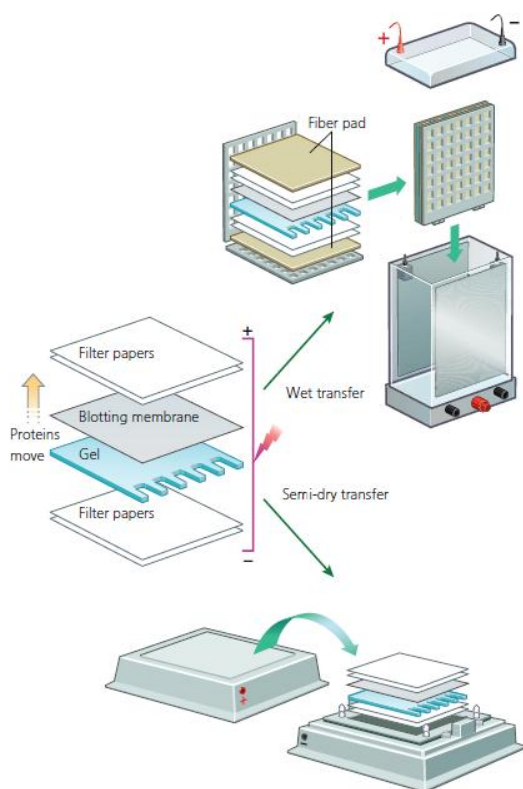
Elektroforeesia varten valettiin 10 % SDS-polyakryyligeeli (SDS-PAGE-geeli) Bio-RAD-telineen (USA) avulla. SDS-PAGE-geeli koostuu ylä- ja alageelistä (ks. Moore 2013). Ylägeelin tarkoitus on konsentroida näytteet, jotta näytteet lähtevät kulkemaan alageeliä yhtenäisenä rintamana. Alageelin tarkoitus on erotella proteiinit molekyylipainon mukaan. Koska näytepuskuri denaturoi näytteet, proteiinit ovat negatiivisesti varautuneita näytepuskurissa (ks. Moore 2013). Elektroforeesissa sähkövirta liikuttaa negatiivisesti varautuneita proteiineja kohti positiivista elektrodia, geelin yläreunalta alareunaan. Proteiinit erottuvat molekyylipainon mukaan siten, että pienet proteiinit liikkuvat nopeammin kuin suuret proteiinit.

Geelien kammat poistettiin lasilevyjen välistä ja kaivoihin pipetoitiin 10 µg näytettä. Kaikki näytteet analysoitiin kolme kertaa. Geelin reunimmaiseen kaivoon pipetoitiin 3 µl värillistä All Blue (Bio-RAD, # 161-0373, USA) tai 2 µl Precision Plus Protein (Bio-RAD, # 161-0376, USA) molekyylipainostandardia. Geelit asetettiin ajokammioon (Bio-RAD) ja ajokammio täytettiin ajopuskurilla. Ajokammio kytkettiin sähkövirtaan ja geelejä ajettiin vaihtuvalla sähkövirralla (150 V) tunnin ajan.

4.2.2 Blottaus

Elektroforeesin jälkeen geelin sisältämät proteiinit siirrettiin sähkövirran avulla Immobilon polyvinyylideenifluoridi-membraanille (PVDF, Millipore, USA). Blottauksessa membraani asetettiin geelin ja positiivisen elektrodin väliin, jotta proteiinit kykenevät siirtymään geeliltä membraanille sähkövirran mukaisesti sivusuunnassa (ks. Moore 2013).

Geeli irrotettiin lasilevyjen välistä ja se siirrettiin blottauspuskuriin odottamaan blottauskasettiin pakkaamista. Blottauskasetin pohjalle kasattiin tyyny, kaksi suodatinpaperia (Whatman, Englanti), geeli, membraani, kaksi suodatinpaperia ja tyyny (ks. kuva 10). Tyynyt ja suodatinpaperit kostutettiin blottauspuskurilla. Membraani aktivoitiin pitämällä se metanolia sisältävässä astiassa kymmenen sekunnin ajan (ks. Moore 2013). Blottauskasetti koottiin tiiviiseen pakettiin ja kasetista poistettiin ilmakuplat. Ilmakuplien poistaminen blottauskasetista on tärkeää, sillä ilmakuplat estävät proteiinien siirtymisen geeliltä membraanille (ks. Moore 203). Ajokammio täytettiin kylmällä blottauspuskurilla ja kammioihin asetettiin blottauskasetit. Kammioihin lisättiin jääsäiliö ja magneettisekoittaja, jotta lämpötila pysyy matalana blottauksen aikana. Ajokammio kytkettiin sähkövirtaan ja blottauskasetteja ajettiin tunnin verran (100 V, 400 mA).

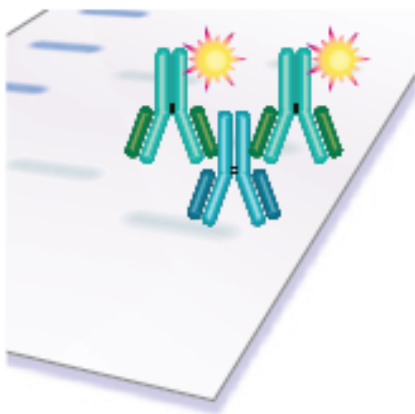


Kuva 10. Blottauskasetin pakkaaminen (ks. Moore 2013).

4.2.3 Spesifisten proteiinien tunnistaminen

Blottauksen jälkeen membraani inkuboitiiin blokkaukspuskurissa, jonka tarkoituksena on estää vasta-aineiden epäspesifinen sitoutuminen. Membraani siirrettiin 50 ml:n Falkon-putkiin siten, että proteiineja sisältävä pinta eli blottauskasetissa geeliä koskettava membraanin pinta on kohti Falkon-putken sisäpuolta. Falkon-putkiin pipetoitiin 3 ml SuperBlock T20 TBS (engl. Tris-buffered saline) -blokkaukspuskuriliuosta. Membraania inkuboitiiin tunnin ajan.

Membraania inkuboitiiin ensin primaari- ja sen jälkeen sekundaarivasta-aineilla. Primaarivasta-aineen inkuboinnissa primaarivasta-aine sitoutuu tutkittavaan proteiiniin (ks. kuva 11, Moore 2013). Tämän jälkeen sekundaarivasta-aine sitoutuu primaarivasta-aineeseen. Sekundaari vasta-aine sisältää fluoresoivan merkkiaineen, jonka avulla tutkittava proteiini tunnistetaan. Primaari- ja sekundaarivasta-aine inkubointien jälkeen membraania pestiin puskurilla (ks. Moore 2013). Pesujen tarkoitus on poistaa membraaniin sitoutumattomat vasta-aineet Falkon-putkista. Vasta-aineiden inkubointien ja pesujen aikana liuokseen lisättiin 0,1 % Tween 20-reagenssia sekä sekundaarivasta-aineen inkubointien aikana 0,01 % SDS:ä. Tween 20:n ja SDS:n tarkoituksena on vähentää membraanin taustan värjäytymistä (ks. Moore 2013, Li-Cor 2011).



Kuva 11. Spesifisen proteiinin tunnistaminen primaari- ja sekundaarivasta-aineiden avulla (ks. Moore 2013)

Blokkauspuskuriliuos poistettiin Falkon-putkista ja membraaneja inkuboitiin yön yli kylmiössä 2 ml:ssa SuperBlock T20 TBS –liuosta, johon oli lisätty 0,1 % Tween 20 -reagenssia (2 µl/ 2 ml) sekä fosfo-β-kateniinia tunnistavaa primaarivasta-ainetta (ks. taulukko 4). Aamulla primaarivasta-aine liuokseen pipetoitiin kokonais-β-kateniinia tunnistavaa vasta-ainetta, jonka jälkeen membraaneja inkuboitiin vielä tunnin verran huoneenlämmössä. Primaarivasta-aineen inkuboinnin jälkeen membraaneja pestiin puoli tuntia 25 ml TBS-liuoksella, johon oli lisätty 0,1 % Tween 20-reagenssia (25 µl/ 25 ml). Pesujen aikana TBS-Tween 20 -liuos vaihdettiin kymmenen minuutin välein. Sen jälkeen membraaneja inkuboitiin tunnin verran SuperBlock T20 TBS -liuoksella, johon oli lisätty 0,1 % Tween 20 -reagenssia (2 µl/ 2 ml), 0,01 % SDS:ä (10 % SDS –liuosta 2 µl/ 2 ml) sekä fluoresoivaa merkkiainetta sisältävää sekundaarivasta-aineita. Membraanit pestiin samalla tavalla kuten edellä mainittiin, mutta pesut tehtiin pimeässä valaistun huoneen sijaan. Sekundaarivasta-aineen merkkiaine on valoherkkä, joten membraanien altistuminen valolle saattaa heikentää mitattua vastetta.

Taulukko 4. Vasta-aineiden inkuboinneissa käytetyt laimennossuhteet

Vasta-aine	Primaarivasta-aine	Sekundaarivasta-aine
Kokonais-β-kateniini	1:4000 (610154 ¹)	1:5000 (680LT ²)
Fosfo-Ser33/37/Thr41-β-kateniini	1:1000 (#9561 ³)	1:5000 (800CW ⁴)
Fosfo-Thr41/Ser45-β-kateniini	1:666 (#9565 ³)	1:5000 (800CW ⁴)
Fosfo-Ser552-β-kateniini	1:1000 (#9566 ³)	1:5000 (800CW ⁴)
Fosfo-Ser675-β-kateniini	1:1000 (#4176 ³)	1:5000 (800CW ⁴)
Fosfo-Tyr654-β-kateniini	1:1000 (ab2492 ⁵)	1:5000 (680LT ²)
β-aktiini	1:40000 (A541 ⁶)	1: 10000 (680LT ²)

¹ Mouse, BD Transduction Laboratories, USA

² Goat anti-mouse IRDye 680LT, Odyssey LI-COR, USA

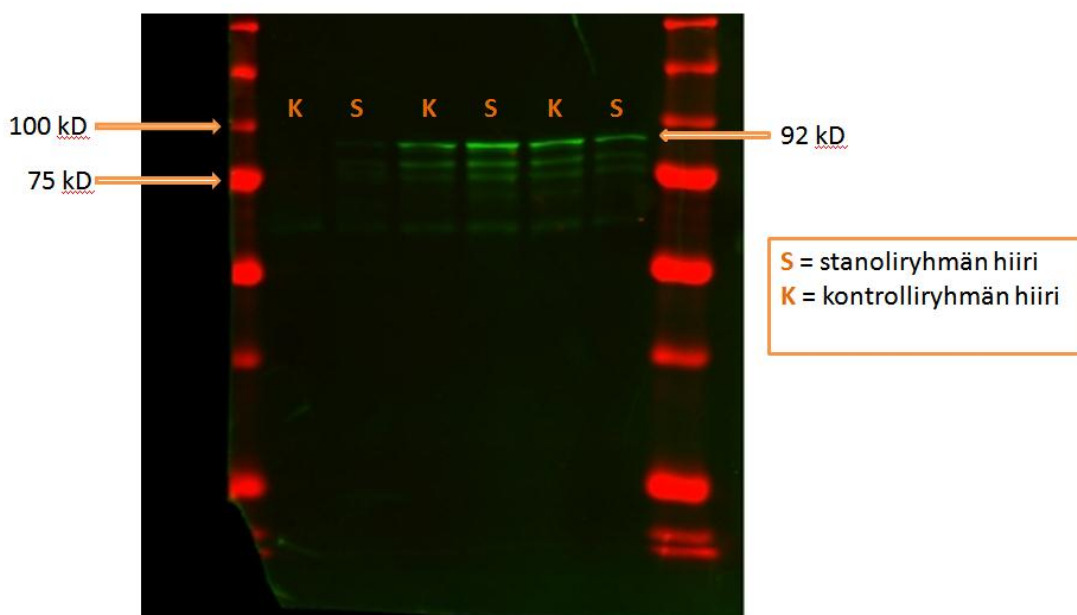
³ Rabbit, Cell Signaling Technology, USA

⁴ Goat, anti-rabbit IRDye 800CW, Odyssey LI-COR, USA

⁵ Mouse, Abcam, USA

⁶ Mouse, Sigma, USA

Tämän jälkeen membraaneja pestiin vielä viisi minuuttia 25 ml TBS -liuoksella. Vasta-aineiden pesussa käytetty Tween 20 -reagenssi aiheuttaa taustaa membraanien kuvantamisessa, joten membraaneja pestiin pelkällä TBS -liuoksella juuri ennen membraanien kuvantamista. Membraanit skannattiin Odyssey infrared imager -laitteella ja kvantitoitiin Odyssey V3.0-ohjelmalla (LI-COR, USA). Laitteella mitattiin sekundaarivasta-aineen fluoresoivan merkkiaineen tuottamaa värin intensiteettiä 700 nm ja 800 nm aallonpituudella. Fosfo- β -kateniini muodot tunnistettiin 800 nm:n ja kokonais- β -kateniini 700 nm aallonpituudella. β -kateniinin ja sen fosforylaatiomuotojen signaalien arvot suhteutettiin taustan värin intensiteettiin, jotta membraanien tuloksia voitiin vertailla keskenään. Lopuksi vielä varmistettiin, että tunnistettu proteiini on β -kateniini. Varmistus tapahtui tarkistamalla tunnistetun proteiinin molekyylipaino molekyylipainomarkkerin avulla. β -kateniini on 92 kDa:n kokoinen, joten sen pitäisi sijoittua All Blue molekyylistandardin 100 kDa ja 75 kDa väliin (ks. kuva 12). Apc^{Min} -hiirillä β -kateniinin ja sen fosforylaatiomuotojen mittaaminen tuotti useita signaaleja eli bändejä.



Kuva 12. Western blotting -kuva fosfo-Ser675- β -kateniinista kasvistanolikokeen hiirillä.

Sisäisenä standardina membraaneista määritettiin vielä ns. housekeeping proteiini, β -aktiini. β -aktiini on konservoitunut proteiini, jonka määrän ajatellaan pysyvän vakiona fysiologisesta tilasta huolimatta. β -aktiinin tuottaman signaalin avulla voidaan varmistaa, että kaikkia näytteitä on pipetoitu yhtä paljon (ks. kuva 9).

β -aktiinin määrittäminen noudatti samoja periaatteita kuin fosfo- ja kokonais- β -kateniinin määrittäminen ja se aloitettiin primaarivasta-aine inkuboinnista. Membraaneja inkuboitiin tunnin ajan 2 ml:ssa Tween-SuperBlock T20 TBS -liuosta, johon oli lisätty β -aktiinia tunnistavaa vasta-ainetta (ks. taulukko 4). Sekundaarivasta-aineen inkuboinnissa lisättiin 2 ml Tween-SDS-SuperBlock T20 TBS -liuosta, joka sisälsi 700 nm aallonpituudella fluoressoivaa kaksoisvasta-ainetta. β -aktiinisignaali mitattiin 700 nm aallonpituudella käyttämällä Odyssey infrared imager -laitetta. β -aktiinisignaali kvantitoitiin ja molekyylipainostandardin avulla varmistettiin, että tunnistettu proteiini on β -aktiini.

4.3 Aineistot

Odyssey infrared imager -kuvantamislaitteella saatiin signaali fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinista solu- ja hiirinäytteissä sekä fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniinista solunäytteissä. Olosuhteita ei saatu optimoitua Odyssey infrared imager -laitteelle soveltuvaksi analysoitaessa fosfo-Tyr654- ja fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniinia solu- ja hiirinäytteistä sekä fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniinia hiirinäytteistä. Kemiluminesenssiin pohjautuvaa menetelmää käytettäessä fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniinin määrittäminen toimi solunäytteille mutta ei hiirinäytteille.

Menetelmän kehittämisen aikana havaittiin, että fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniiniipitoisuudet vaihtelivat huomattavasti näytteiden välillä. Erojen pitoisuuksissa oli etenkin Apc^{Min} -hiirinäytteissä. Tästä johtuen päätettiin määrittää fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniiniipitoisuudet näytteistä, jotka olivat peräisin kahdesta osastolla aikaisemmin tehdyistä Apc^{Min} -hiiritutkimuksesta. Toisessa oli tutkittu kasvistanolien ja toisessa ns. länsimaisen dieetin vaikutusta suolistokasvaimien kehittymiseen.

Molemmissa tutkimuksissa käytetyt Apc^{Min} -hiiret olivat peräisin Jackson Laboratoriosta (Bar Harbor, ME, USA). Apc^{Min} -hiirillä *APC*-alleeli on mutatoitunut, minkä seurauksena hiirille muodostuu spontaanisti suolistokasvaimia (Carothers ym. 2001). Apc^{Min} -hiirillä suolistosyövän etiologiaan liittyy oleellisesti β -kateniinin säätelyjärjestelmän häiriintyminen, sillä APC säätelee β -kateniinin hajottamista (ks. kirjallisuuskatsaus). Apc^{Min} -hiirien suolistokasvaimien etiologia on

samankaltainen kuin ihmisten *FAP*-sairaus (*engl. familial adenomatous polyposis*), jossa toinen *APC*-alleeli on mutatoitunut (ks. Reya & Clevers 2005).

Apc^{Min}-hiirinäytteissä β -kateniinilla ja sen fosforylaatiomuodoilla (Ser552 ja Ser675) näkyi monta vasta-aineiden tunnistamaa bändiä kemiluminesenssiin ja fluoresenssiin pohjautuvilla menetelmillä. Bändien määrä riippui näytteistä ja käytetyistä vasta-aineista. Hiirinäytteistä analysoitiin ylin ja kolme ylintä bändiä kokonais- β -kateniinista, fosfo-Ser675- β -kateniinista ja fosfo-Ser552- β -kateniinista. Tästä poiketen kasvistanolikokeen fosfo-Ser552- β -kateniinista kvantioitiin ainoastaan ylin bändi vasta-aineen tuottaman heikon signaalin vuoksi. Ylimmän ja kolmen ylimmän bändin tulokset eivät eronneet toisistaan. Näytteiden tuottamia alimpia bändejä ei analysoitu, koska ne ovat todennäköisesti β -kateniinin hajoamistuotteita (Moore 2013).

4.3.1 Kasvistanolidieettitutkimuksen asetelma

Viiden viikon ikäiset C57BL/6J *Apc*^{Min/+}-hiiret oli satunnaistettu kahteen samankaltaiseen viidentoista hiiren ryhmään. Toiselle ryhmälle oli syötetty 0,8 % kasvistanolidieettiä yhdeksän viikon ajan ja toinen ryhmä oli saanut samantyyppistä ruokavaliota ilman kasvistanolilisää. Kasvistanolidieetti pohjautui AIN93-G-dieettiin, johon oli lisätty kasvistanoliesteriä sisältäviä elintarvikkeita. Kontrolliryhmä oli saanut puolestaan AIN93-G-dieettiä ja kasvistanoliryhmän kanssa samankaltaisia elintarvikkeita, joihin ei ollut lisätty kasvistanoliesteriä. Kasvistanoli- ja kontrolliryhmässä oli kahdeksan urosta ja seitsemän naarasta. Ennen tutkimuksen päättymistä kasvistanoliryhmästä oli jouduttu lopettamaan yksi uros ja kontrolliryhmästä yksi naaras suuren painonmenetyksen vuoksi. Näiden hiirien tulokset oli jätetty huomiotta tulosten analysoinnissa.

4.3.2 Länsimainen dieetti -tutkimuksen asetelma

Viiden viikon ikäiset C57BL/6J *Apc*^{Min/+}-hiiret oli satunnaistettu kahteen samankaltaiseen ryhmään. Länsimaista dieettiä saaneessa ryhmässä oli kaksitoista ja kontrolliryhmässä neljatoista hiirtä. Molemmissa ryhmissä oli yhtä monta naarasta ja urosta. Ravitsemussuositukseen nähden länsimainen dieetti sisälsi paljon rasvaa, etenkin tyydyttynyttä rasvaa sekä niukasti kuitua, D-vitamiinia, kalsiumia ja foolihappoa. Tämän tutkimuksen länsimainen dieetti vastasi Newmark ym. (2001) tutkimuksessa käytettyä länsimaista dieettiä muilta osin, paitsi että tässä tutkimuksessa rasvan laatua oli muokattu vastaamaan paremmin länsimaista ruokavaliota. Newmark ym. (2001)

tutkimuksessa länsimaisen dieetin rasva koostui pelkästään maissiöljystä, kun taas tässä tutkimuksessa dieetti sisälsi paljon maitorasvaa ja jonkin verran rypsi- ja auringonkukanöljyä. Kontrolliryhmälle puolestaan oli syötetty AIN-93G-dieettiä. Dieettejä oli syötetty hiirille kymmenen viikon ajan.

4.3.3 Hiirien lopetus ja näytteiden käsittely Western blotting -menetelmää varten

Tutkimusjakson jälkeen hiiret oli lopetettu hiilidioksikaasulla (Marttinen ym. 2013). Suolistokasvaimien määrä ja koko oli määritetty mikroskoopin avulla. Kudosnäytteet oli kerätty ohutsuolen distaalialueen normaalista limakalvosta myöhempiä määrittelyjä varten.

Kudosnäytteistä oli eristetty proteiinit Western blotting -menetelmää varten. Misikankaan ym. (2005) tutkimuksessa on yksityiskohtaisesti selitetty, miten kudosnäytteitä oli esikäsitelty. Proteiinien pilkkoutuminen oli estetty lisäämällä kudosnäytteisiin 0,4 mM leupeptiini-, 3,0 μ M pepstatiini- ja 1,0 mM fenyyylimetyylisulfonyyli fluoridi (PMSF) -liuoksia (Marttinen ym. 2013). Solukalvojen rikkoutuminen oli saatu aikaan lisäämällä 10 % Triton-X-liuosta. Näytteitä oli inkuboitu kahdenkymmenen minuutin ajan viiden minuutin välein voimakkaasti sekoittaen. Lopuksi näyte oli sentrifugoitu (15 000 rpm, 10 min, 4°C). Kudosnäytteen proteiinia sisältävä supernatantti oli kerätty ja näytteiden proteiinipitoisuudet oli mitattu (Misikangas ym. 2005). Näytteet oli varastoitu -70°C:ssa myöhempiä määrittelyjä varten.

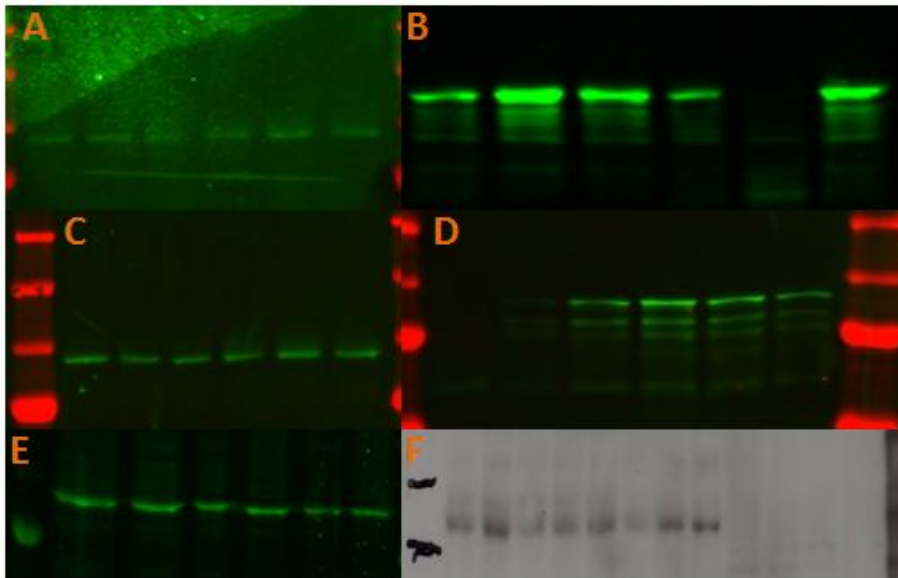
4.4 Tilastolliset menetelmät

Tulokset analysoitiin PASW Statistics 18.0 -ohjelmalla käyttämällä ei-parametristä Mann-Whitney U-testiä ja ei-parametristä Spearmanin järjestyskorrelaatiota. Tutkimuksessa analysoitiin ryhmien välisiä eroja Mann-Whitneyn U-testillä ja kahden riippumattoman muuttujan välistä yhteyttä Spearmanin järjestyskorrelaatiolla. Pro gradu -tutkielmassa käytettiin ei-parametrisiä analysointimenetelmiä, koska otoskoot olivat pieniä. Tulokset katsottiin tilastollisesti merkitseväksi, kun p-arvo on pienempi kuin 0,05.

5 Tulokset

5.1 Western blotting –menetelmän optimointi β -kateniinin fosforylaatiomuodoille

Fluoresenssiin pohjautuva menetelmä toimi määrittettäessä fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinia solu- ja hiirinäytteistä sekä fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniinia solunäytteistä (ks. kuva 13). Olosuhteita ei saatu optimoitua fluoresenssiin perustuvalla menetelmälle soveltuvaksi analysoitaessa fosfo-Thr41/Ser45- ja fosfo-Tyr654- β -kateniinia solu- ja hiirinäytteistä sekä fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniinia hiirinäytteistä. Sen sijaan kemiluminesenssiin pohjautuva menetelmä toimi määrittettäessä fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniinia solunäytteistä, mutta ei hiirinäytteistä. Optimoidut primaari- ja sekundaarivasta-ainepitoisuudet kokonais- β -kateniinin, β -kateniinin fosforylaatiomuotojen ja β -aktiinin määrittämiseksi fluoresenssiin perustuvalla menetelmällä on esitetty taulukossa 5 ja kemiluminesenssiin pohjautuvalla menetelmällä taulukossa 6.



Kuva 13. (A) Fosfo-Ser552- β -kateniini HGF:llä käsitellyissä sekä HGF:llä ja lakkauutteella käsitellyissä HCA7-soluista (B) Fosfo-Ser552- β -kateniini kasvistanolikokeen Apc^{Min}-hiirinäytteistä (C) Fosfo-Ser675- β -kateniini HGF:llä käsitellyissä HT29- ja HCA7-soluista (D) Fosfo-Ser675- β -kateniini kasvistanolikokeen Apc^{Min}-hiirinäytteistä (E) Fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniini HGF:llä käsitellyissä sekä HGF:llä ja lakkauutteella käsitellyissä HCA7-soluista (F) Fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniini solu- ja hiirinäytteistä. Kahdeksan bändiä vasemmalta ovat HGF:llä käsiteltyjen HT29- ja HCA7-solujen näytteitä. Neljä viimeistä näytettä ovat pellavadieettikokeen Apc^{Min}-hiirinäytteitä.

Taulukko 5. Optimoidut vasta-ainepitoisuudet Odyssey infrared imager -laitteelle

Vasta-aine	Primaarivasta-aine	Sekundaarivasta-aine Odyssey
Kokonais- β -kateniini	1:4000 (610154)	1:5000 (680LT)
Fosfo-Ser33/37/Thr 41- β -kateniini	1:1000 (#9561)	1:5000 (800CW)
Fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniini	1:666 (#9565)	1:5000 (800CW)
Fosfo-Ser552- β - kateniini	1:1000 (#9566)	1:5000 800CW)
Fosfo-Ser675- β - kateniini	1:1000 (#4176)	1:5000 (800CW)
β -aktiini	1:40000 (A541)	1: 10000 (680LT)

Taulukko 6. Optimoidut vasta-ainepitoisuudet kemiluminesenssiin perustuvalle Western blotting -menetelmälle

Vasta-aine	Primaarivasta- aine	Sekundaarivasta-aine
Kokonais- β -kateniini	1:2000 (A1907 ¹)	1:2000 (346343 ²)
Fosfo-Thr41/Ser45- β - kateniini	1:666 (#9565)	1:2000 (346343 ²)
β -aktiini	1:4000 (A541)	1: 2000 (NA931 ³)

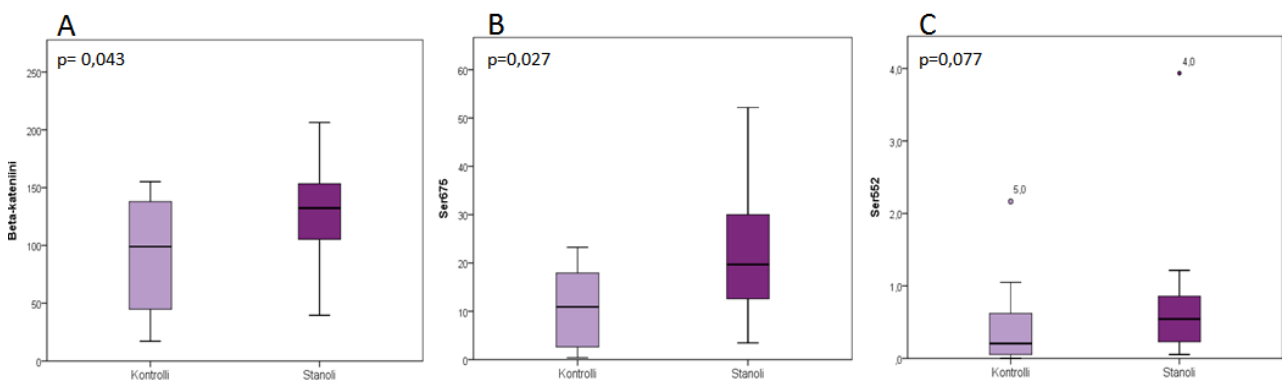
¹Rabbit, Santa Cruz Biotechnology, USA²Donkey anti-rabbit, GE Health, USA³Sheep anti-mouse, GE Health, USA

Kasvistanolitutkimuksen ja länsimainen dieetti -tutkimuksen tulososiossa esitellään pro gradu -tutkielmaa varten määritettyjen kokonais- ja fosfo- β -kateniinin tulosten lisäksi muita tuloksia. Niitä ei ole määritetty tämän pro gradu -tutkielman kokeellisessa osuudessa, vaan aikaisempien tutkimusprojektien puitteissa. Näitä tuloksia tarkastellaan suhteessa mitattuihin fosfo- β -kateniineihin ja käytetään ymmärtämään fosfo- β -kateniinin merkitystä suolistokasvaimien kehittämisessä.

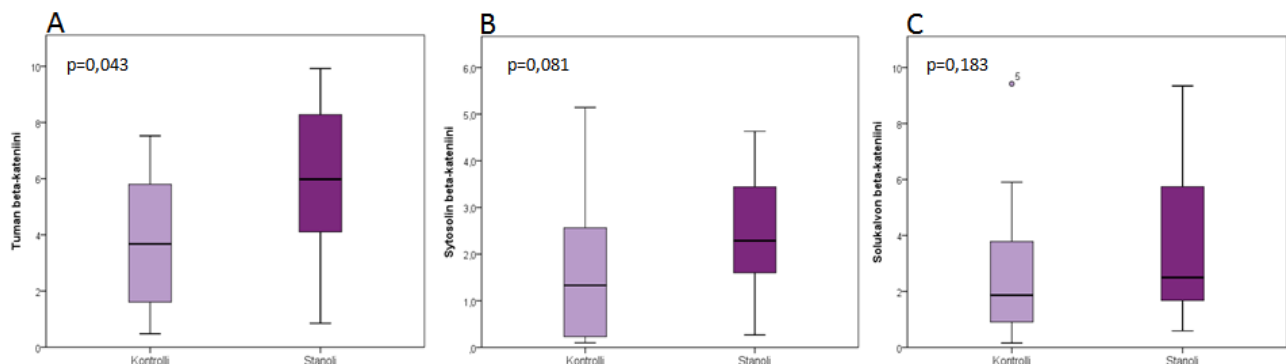
5.2 Kasvistanolitutkimus

5.2.1 Kasvistanolien vaikutus suolen limakalvon β -kateniiniin

Kokonais- ($p=0,043$) ja fosfo-Ser675- β -kateniinia ($p=0,027$) oli merkitsevästi enemmän kasvistanolihiirillä kuin kontrollihiirillä (ks. kuva 14A ja 14B). Fosfo-Ser552- β -kateniini noudatti samaa trendiä kuin fosfo-Ser675- β -kateniini, mutta ryhmien välinen ero ei aivan saavuttanut tilastollista merkitsevyyttä ($p=0,077$, ks. kuva 14C). Kasvistanoliryhmällä kokonais- β -kateniinia oli kerääntynyt merkitsevästi enemmän tumaan ($p=0,043$) verrattuna kontrolliryhmään (ks. kuva 15A). Myös sytosolin β -kateniinin suhteen oli havaittavissa samanlainen suunta, vaikka ero ryhmien välillä ei saavuttanutkaan tilastollista merkitsevyyttä ($p=0,081$, ks. kuva 15B). Solukalvon β -kateniinin pitoisuuksilla ei ollut tilastollista eroa ryhmien välillä (ks. kuva 15C).



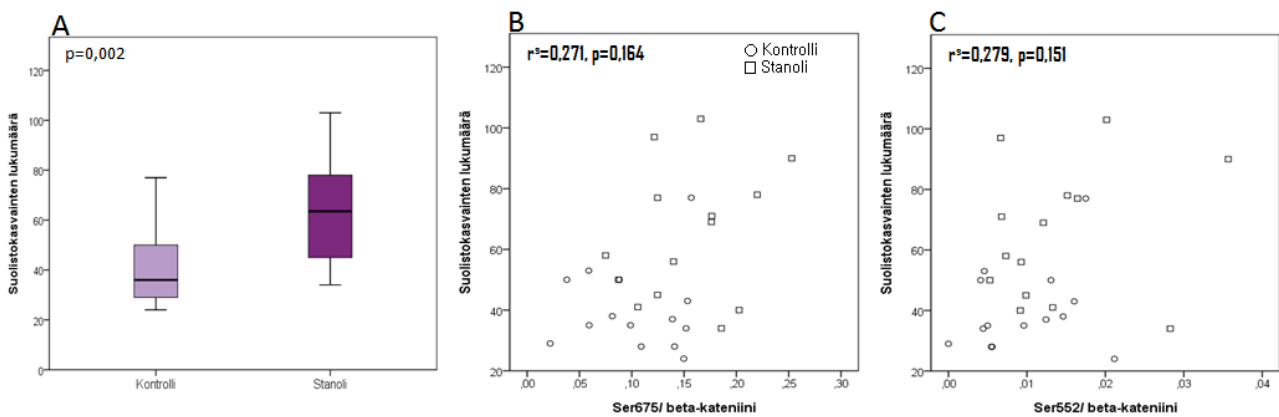
Kuva 14. Suolen limakalvon kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinipitoisuudet kasvistanolitutkimuksen hiirillä.



Kuva 15. Tuman, sytosolin ja solukalvon fraktioiden kokonais- β -kateniinipitoisuudet kasvistanolitutkimuksen hiirien suolen limakalvonäytteissä.

5.2.2 β -kateniinin yhteys suolistokasvaimien kehittymiseen kasvistanolitutkimuksessa

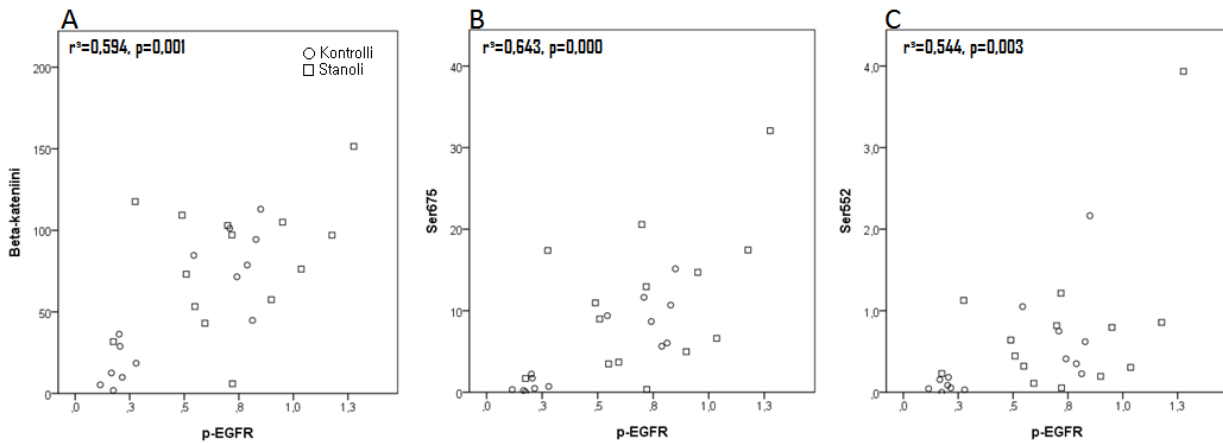
Kasvistanoliryhmän hiirillä oli merkitsevästi enemmän suolistokasvaimia ($p=0,002$) koko ohutsuolen alueella verrattuna kontrolliryhmän hiiriin (ks. kuva 16A). Sen sijaan suolistokasvaimien koko ei eronnut merkitsevästi ryhmien välillä ($p=0,383$). Suolistokasvaimien lukumäärä ei korreloinut tilastollisesti merkitsevästi β -kateniinin fosforyloituneiden muotojen (Ser675 ja Ser552) ja kokonais- β -kateniinin suhteen kanssa ($r^s=0,271$, $p=0,164$; $r^s=0,279$, $p=0,151$, ks. kuva 16B ja 16C). Suolistokasvaimien koko ei myös korreloinut β -kateniinin fosforyloitujen muotojen (Ser675 ja Ser552) ja kokonais- β -kateniinin suhteen kanssa ($r^s=0,302$, $p=0,119$; $r^s=-0,041$, $p=0,838$).



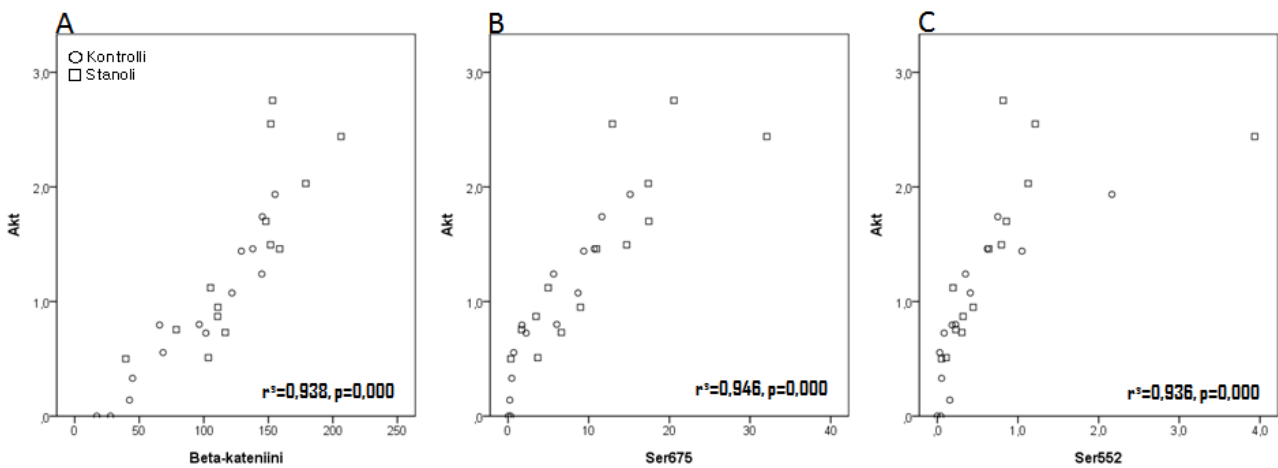
Kuva 16. Suolistokasvaimien lukumäärä koko ohutsuolen alueella kasvistanolitutkimuksen hiirillä (A). Suoliston limakalvon fosfo- β -kateniinin (Ser675 ja Ser552) ja kokonais- β -kateniinin suhteen korrelaatio suolistokasvaimien lukumäärään (B ja C).

5.2.3 β -kateniini ja muut signaalireitit kuin Wnt-reitti kasvistanolitutkimuksessa

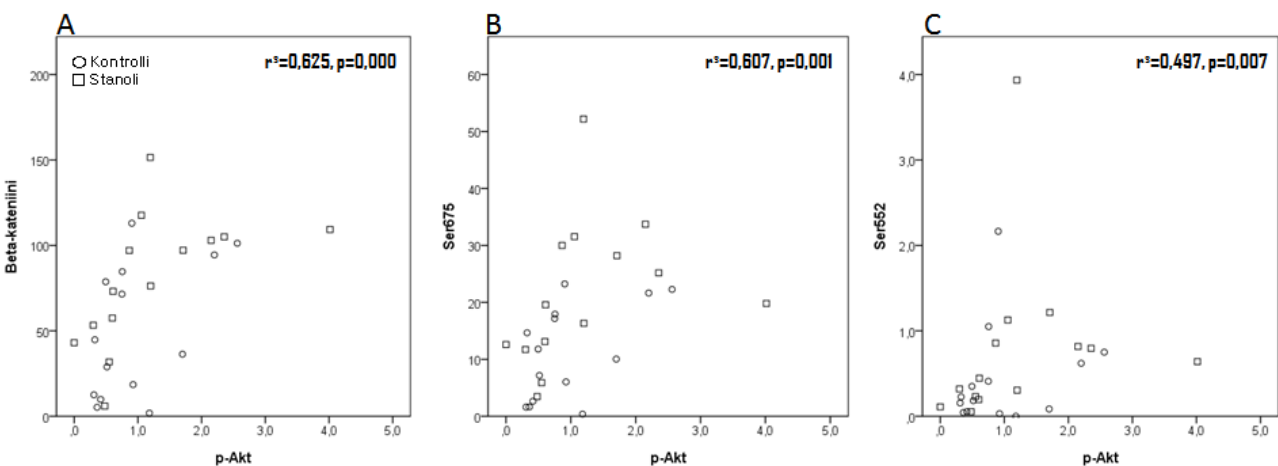
Kasvistanolitutkimuksen hiirien suoliston limakalvonäytteiden kokonais-, fosfo-Ser552- ja fosfo-Ser675- β -kateniinipitoisuudet korreloivat tilastollisesti merkitsevästi fosfo-EGFR:n ($p=0,001$, $p=0,000$, $p=0,003$, ks. kuva 17), Akt:n ($p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,000$, ks. kuva 18), fosfo-Akt:n ($p=0,000$, $p=0,001$, $p=0,007$, ks. kuva 19) ja tuman sykliini D1:n ($p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,000$, ks. kuva 20) kanssa. Fosfo-EGFR:ä ($p=0,089$), tuman sykliini D1:ä ($p=0,065$) ja Akt:a ($p=0,077$) oli systemaattisesti enemmän kasvistanolia saaneilla hiirillä kuin kontrollihiirillä (ks. kuva 21, Marttinen ym. 2013) ja arvioimme nämä erot biologisesti merkittäviksi, vaikka ne eivät aivan saavuttaneetkaan tilastollista merkitsevyyttä. Fosfo-Akt-pitoisuudet eivät sen sijaan eronneet tilastollisesti merkitsevästi ryhmien välillä ($p=0,491$).



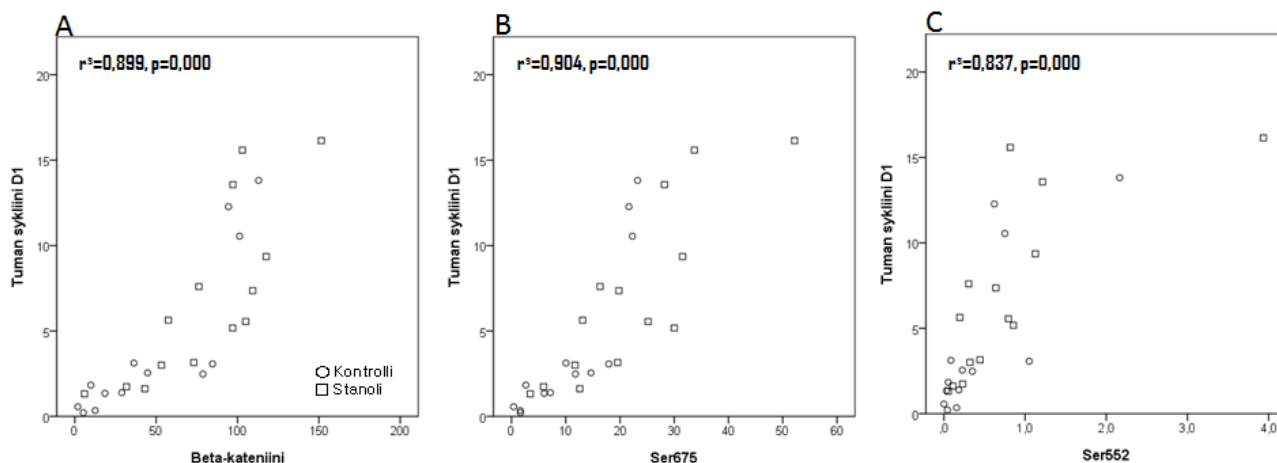
Kuva 17. Kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinin korrelaatio fosfo-EGFR:n kanssa kasvistanolitutkimuksen hiirien suoliston limakalvonäytteissä.



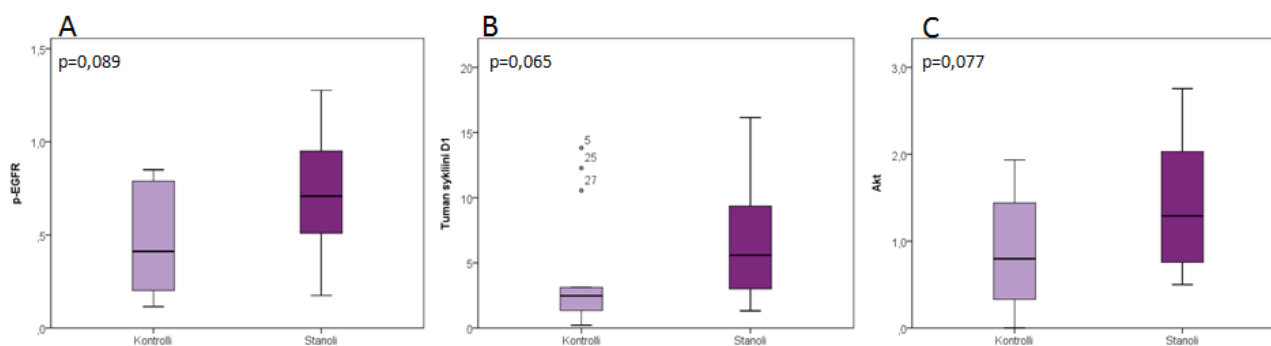
Kuva 18. Kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinin korrelaatio Akt:n kanssa kasvistanolitutkimuksen hiirien suoliston limakalvonäytteissä.



Kuva 19. Kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinin korrelaatio fosfo-Akt:n kanssa kasvistanolitutkimuksen hiirien suoliston limakalvonäytteissä.



Kuva 20. Kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinin korrelaatio tuman sykliini D1:n kanssa kasvistanolitutkimuksen hiirien suoliston limakalvonäytteissä.

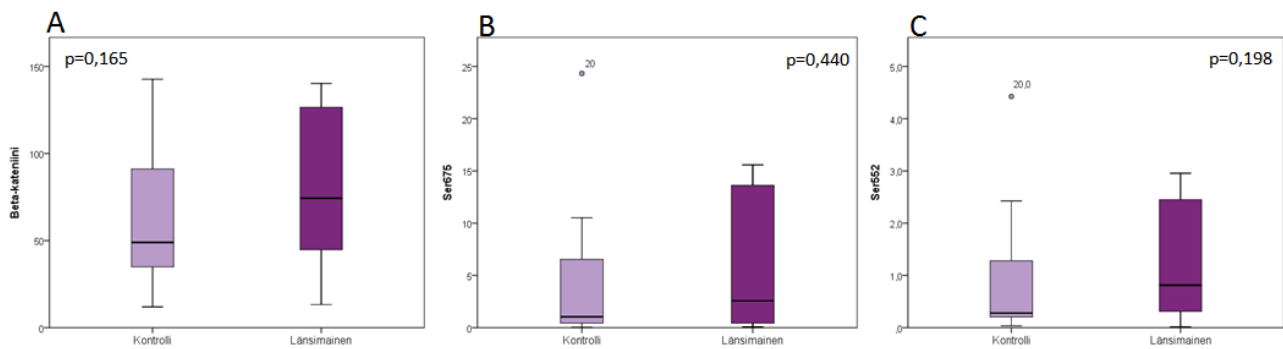


Kuva 21. Fosfo-EGFR-, tuman sykliini D1- ja Akt-pitoisuudet kasvistanolitutkimuksen hiirien suoliston limakalvonäytteissä.

5.3 Länsimainen dieetti -tutkimus

5.3.1 Länsimaisen dieetin vaikutus suolen limakalvon β -kateniiniin

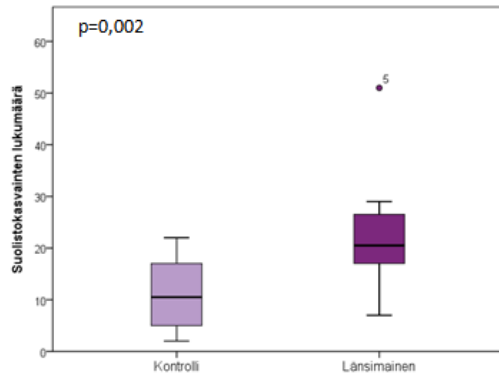
Kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinipitoisuuksissa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa dieettiryhmien välillä (ks. kuva 22). Vaikka erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä, länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä oli johdonmukaisesti enemmän kokonais- β -kateniinia ja sen fosforylaatiomuotoja (Ser552 ja Ser675) kuin kontrollihiirillä. Tuloksissa on suuri hajonta, joten otoskoko on voinut olla liian pieni tilastollisesti merkitsevien erojen havaitsemiseksi (ks. kuva 22).



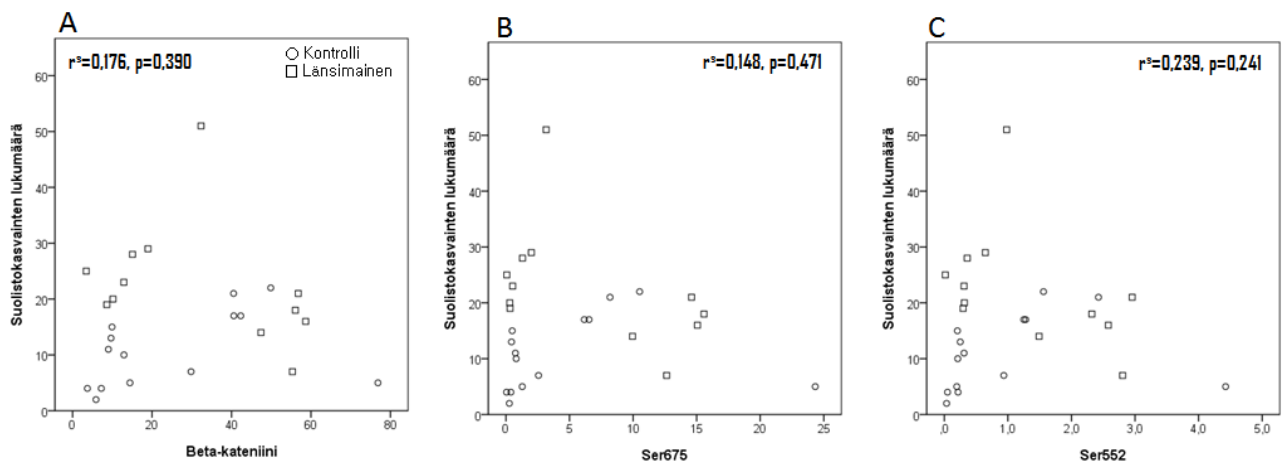
Kuva 22. Kokonais- β -kateniinin ja sen fosforyloituneiden muotojen (Ser675 ja Ser552) pitoisuudet länsimainen dieetti -tutkimuksen hiirien suoliston limakalvonäytteissä.

5.3.2 β -kateniini yhteys suolistokasvaimien kehittymiseen länsimainen dieetti -tutkimuksessa

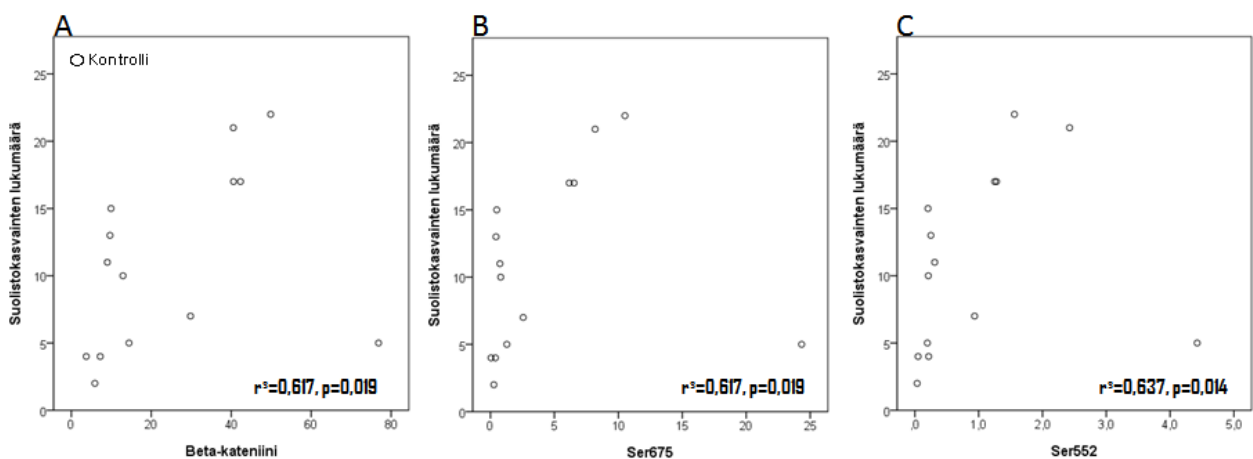
Suolistokasvaimia oli merkitsevästi enemmän ($p=0,002$) ohutsuolen D1- ja D2-alueilla länsimaista dieettiä saaneella ryhmällä verrattuna kontrolliryhmään (ks. kuva 23). Sen sijaan suolistokasvaimien keskimääräinen koko D1- ja D2 -alueilla ei tilastollisesti merkitsevästi eronnut ryhmien välillä ($p=0,572$). Sama ilmiö oli havaittavissa kauttaaltaan koko ohutsuolen alueella, mutta se korostui erityisesti D1- ja D2 -alueilla, ja siksi tässä työssä suolistokasvaimien tulokset on esitetty D1- ja D2-alueilta. Kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinipitoisuudet eivät korreloineet suolistokasvaimien lukumäärän kanssa, kun tulosten analysoinnissa käytettiin molempien ryhmien tuloksia (ks. kuva 24). Jos ryhmiä tarkastellaan erikseen, kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinipitoisuudet korreloivat suolistokasvaimien lukumäärän kanssa kontrolliryhmällä (ks. kuva 25), kun taas ne eivät korreloineet länsimaista dieettiä saaneella ryhmällä (ks. kuva 26). Kokonais- β -kateniini ja sen fosforyloituneet muodot (Ser675 ja Ser552) eivät korreloineet suolistokasvaimien koon kanssa ($r^s=0,210$, $p=0,303$; $r^s=0,248$, $p=0,222$; $r^s=0,234$, $p=0,250$).



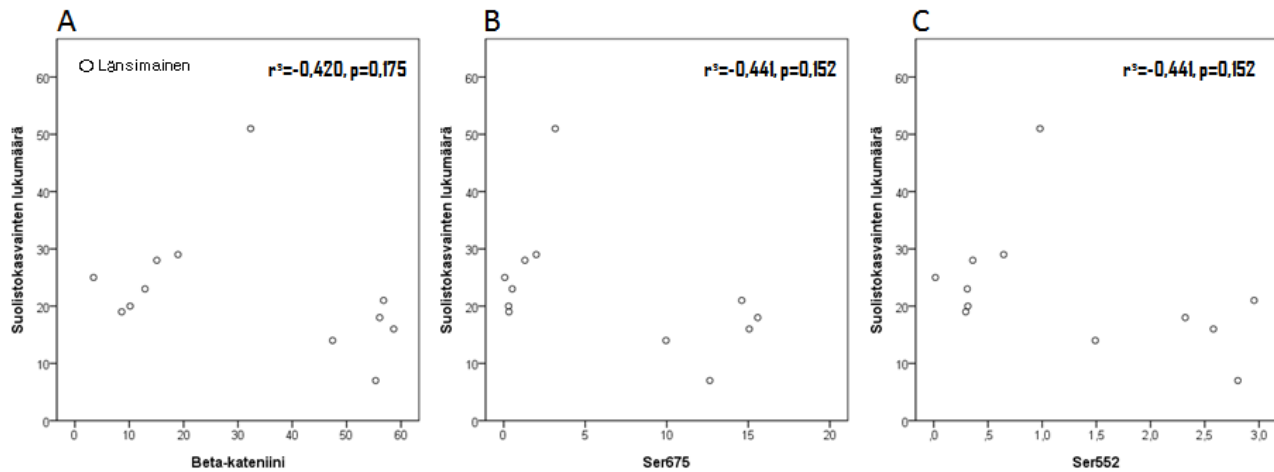
Kuva 23. Suolistokasvaimien keskimääräinen lukumäärä ohutsuolen D1- ja D2 –alueilla länsimaisen dieetti –tutkimuksen hiirillä.



Kuva 24. Suoliston limakalvon kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinipitoisuuksien korrelaatio suolistokasvaimien lukumäärään ohutsuolen D1- ja D2 -alueilla länsimaista dieettiä saaneella ryhmällä ja kontrolliryhmällä.



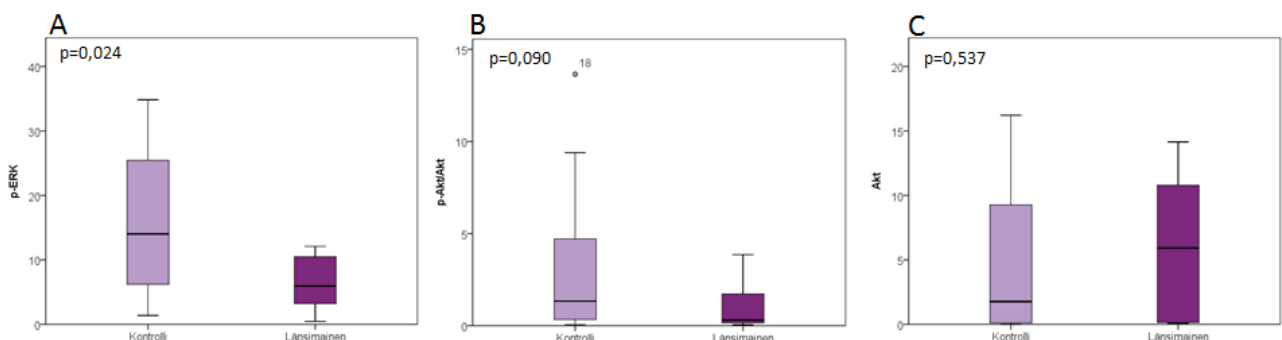
Kuva 25. Suoliston limakalvon kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinipitoisuuksien korrelaatio suolistokasvaimien lukumäärään ohutsuolen D1- ja D2 -alueilla kontrolliryhmällä.



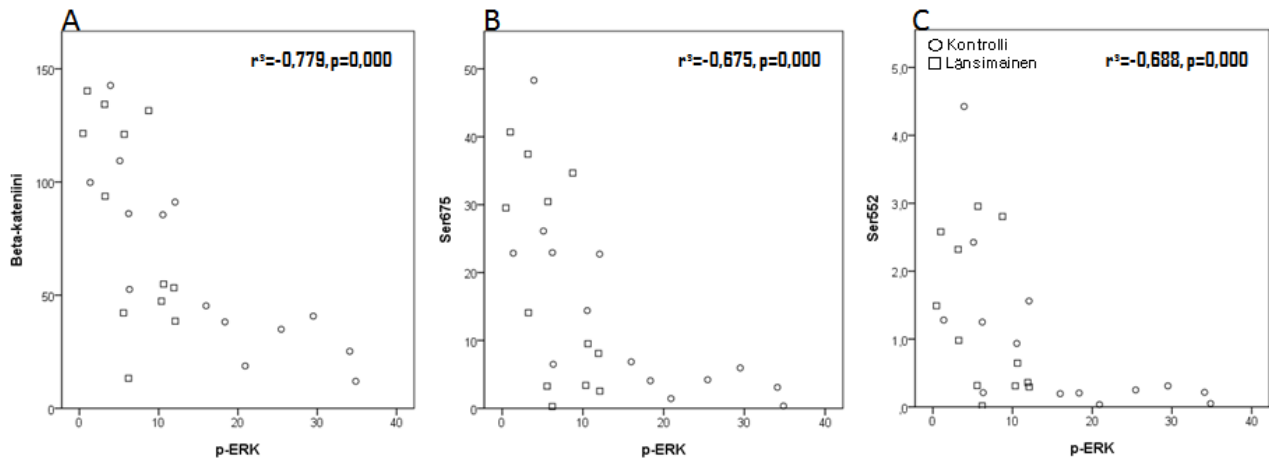
Kuva 26. Suoliston limakalvon kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinipitoisuuksien korrelaatio suolistokasvainten lukumäärään ohutsuolen D1- ja D2 -alueilla länsimaista dieettiä saaneella ryhmällä.

5.3.3 β -kateniini ja muut signaalireitit kuin Wnt-reitti länsimainen dieetti -tutkimuksessa

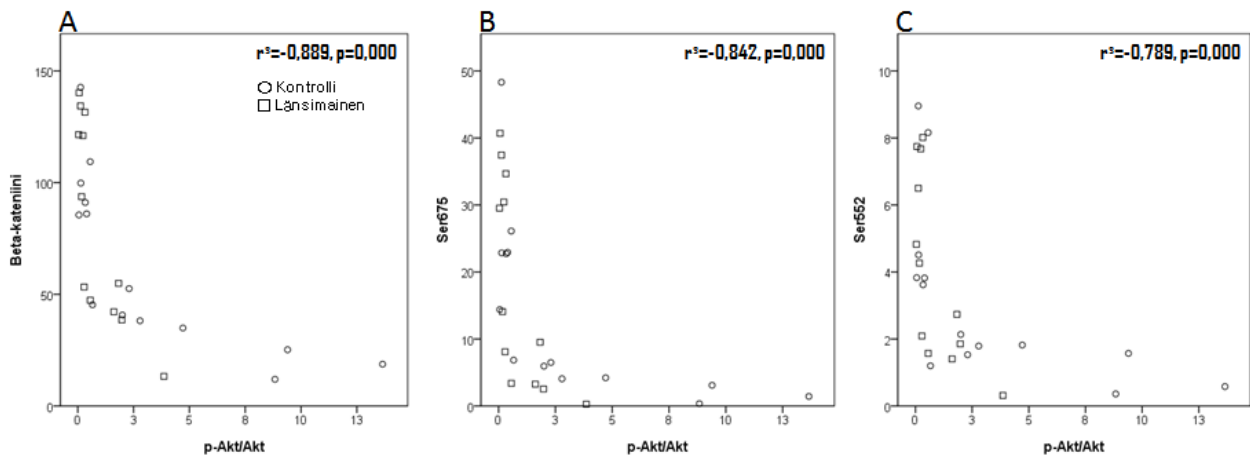
Fosfo-ERK-pitoisuudet olivat merkitsevästi pienempiä ($p=0,024$) sekä fosfo-Akt:n ja kokonais-Akt:n suhde (kuva Akt:n aktivaatiota) oli lähes merkitsevästi pienempi ($p=0,090$) länsimaista dieettiä saaneella ryhmällä kuin kontrolliryhmällä (ks. kuvat 27A ja 27B). Sen sijaan keskimääräinen kokonais-Akt-pitoisuudet olivat länsimaista dieettiä saaneella ryhmällä johdonmukaisesti suurempia kuin kontrolliryhmällä, vaikka ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p=0,537$, ks. kuva 27C). β -kateniini ja sen fosforylaatiomuodot (Ser552 ja Ser675) korreloivat käänteisesti fosfo-ERK:n ($p=0,000$) sekä fosfo-Akt:n ja kokonais-Akt:n suhteen ($p=0,000$) kanssa (ks. kuvat 28 ja 29). Sen sijaan kokonais-, fosfo-Ser552- ja fosfo-Ser675- β -kateniini korreloivat kokonais-Akt:n kanssa (ks. kuva 30).



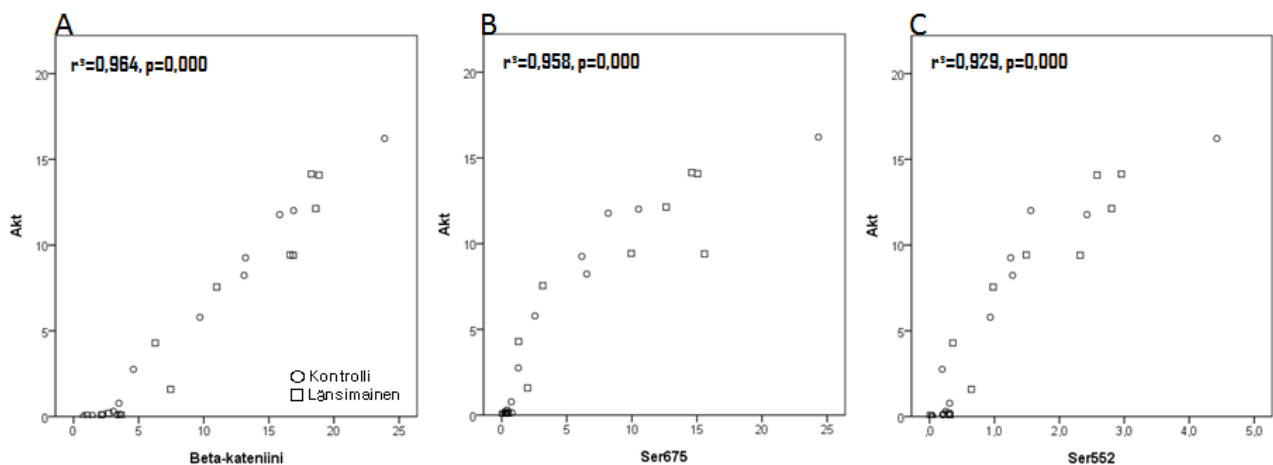
Kuva 27. Fosfo-ERK, fosfo-Akt:n ja kokonais-Akt:n suhde sekä kokonais-Akt pitoisuudet suoliston limakalvolla länsimainen dieetti -tutkimuksen hiirien suoliston limakalvonäytteissä.



Kuva 28. Kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinin korrelaatio fosfo-ERK:n kanssa länsimaisen dieetti -tutkimuksen hiiren suoliston limakalvonäytteissä.



Kuva 29. Kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinin korrelaatio fosfo-Akt:n ja kokonais-Akt:n suhteen kanssa länsimaisen dieetti -tutkimuksen hiiren suoliston limakalvonäytteissä.



Kuva 30. Kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinin korrelaatio kokonais-Akt:n kanssa länsimäinen dieetti -tutkimuksen hiiren suoliston limakalvonäytteissä.

6 Tulosten pohdinta

6.1 Western blotting –menetelmän optimointi fosfo- β -kateniinille

Odyssey Infrared imager –laitteella saatiin signaali fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinista solu- ja hiirinäytteistä sekä fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniinista solunäytteistä. Fluoresenssiin pohjautuva menetelmä ei toiminut määrittäessä fosfo-Thr41/Ser45- ja Tyr654- β -kateniinia solu- ja hiirinäytteistä eikä fosfo-Ser33/37Thr41- β -kateniinia hiirinäytteistä. Sen sijaan kemiluminesenssiin perustuva menetelmä toimi fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniinin määrittämiseksi solunäytteistä, mutta ei hiirinäytteistä.

Fosfo-Ser552- β -kateniinin määrittämisessä muodostuu herkemmin tuloksen luotettavuutta heikentävää taustaa kuin fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniinin määrittämisessä (vrt. kuvat 13A, 13C ja 13E). Taustan vähentämiseksi primaarivasta-aineen inkubointivaiheessa lisättiin Tween 20:ä ja sekundaarivasta-aineen inkubointivaiheessa Tween 20:ä ja SDS:ä. Tausta lisää tulosten hajontaa, mikä vaikeuttaa todellisten erojen havaitsemista näytteiden välillä. Kasvistanolitutkimuksessa fosfo-Ser552- β -kateniinipitoisuudet eivät aivan eronneet tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,077$) ryhmien välillä, kun taas fosfo-Ser675- β -kateniinipitoisuudet erosivat ($p=0,027$). Tulevaisuudessa fosfo-Ser552- β -kateniinin määrittämistä fluoresenssiin perustuvalla menetelmällä tulisi edelleen kehittää siten, että taustan aiheuttaman virheen määrä saataisiin pienemmäksi. Taustaa voisi yrittää pienentää edelleen lisäämällä primaarivasta-aineiden inkubointivaiheessa Tween 20:n ja sekundaarivasta-aineiden inkubointivaiheessa Tween 20:n ja SDS:n määrää (ks. Li-Cor 2012).

Huomioitavaa on myös se, että Odyssey Infrared imager –laitteella kuvannettu liian suuri signaali saattaa vuotaa toiselle kanavalle, mikä heikentää tulosten luotettavuutta. Kuvannettaessa samanaikaisesti kokonais- ja fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniinia HGF käsitellyistä HCA7-solunäytteistä mitattu kokonais- β -kateniini ylivalottui, mikä on saattanut vaikuttaa fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniinin tuottamaan signaaliin (ks. kuva 13E). Koska kemiluminesenssiin pohjautuvalla menetelmällä fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniinista saatiin signaali HGF-käsitellyissä HCA7-solunäytteistä, on todennäköistä, että samoissa solunäytteissä on myös fosfo-33/37/Thr41- β -kateniinia, vaikka sitä ei pystyttykään määrittämään fluoresenssiin pohjautuvalla

menetelmällä. Tämä johtuu siitä, että molemmat fosforylaatiomuodot liittyvät β -kateniinin hajottamiseen.

β -kateniinin hajottamiseen liittyvistä fosforylaatiomuodoista, fosfo-Ser33/37/Thr41- ja fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniinista, saatiin signaali paksusuolisyövän solunäytteistä, mutta ei Apc^{Min} -hiirinäytteistä. Tämä voi johtua siitä, että (a) näiden fosfo- β -kateniinimuotojen määrittämisen olosuhteiden optimointi ei toiminut hiirinäytteillä (b) β -kateniinin hajottaminen tapahtuu nopeasti *in vivo* (Munemitsu ym. 1996), minkä vuoksi hiirinäytteissä ei ollut kumpaakaan fosforylaatiomuotoa lainkaan tai riittävästi signaalin havaitsemiseksi. β -kateniinin säätely saattaa olla nopeampaa kudoksessa kuin solunäytteissä, koska β -kateniinin hajottamista säädellään solun ulkopuolisten viestimolekyylien avulla (Topol ym. 2003).

Fosfo-Tyr654- β -kateniinista ei saatu signaalia Apc^{Min} -hiirien ja HCA7-paksusuolisyöpäsolujen näytteistä. Tämä voi johtua siitä, ettei menetelmää saatu optimoitua tai β -kateniinia ei ollut fosforyloitunut riittävän paljon tyrosiini654-aminohappotähteestä fluoresenssiin pohjautuvalla menetelmällä havaittavaksi. Fosfo-Tyr654- β -kateniini on fosforylaatiomuoto, joka edistää β -kateniinin irtoamista soluliitoksista ja β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä (Roura ym. 1999). β -kateniinin irtoaminen soluliitoksista on yhdistetty syövän etenemiseen invasiiviseksi syöväksi (Brembeck ym. 2004). Kasvistanolikokeen Apc^{Min} -hiiriltä fosfo-Tyr654- β -kateniinia määritettiin terveestä limakalvosta, jossa sitä on todennäköisesti vähemmän kuin kasvainkudoksessa. Tulevaisuudessa fosfo-Tyr654- β -kateniinin määritysolosuhteiden optimointiin kannattaa käyttää Apc^{Min} -hiirien kasvainkudosta terveen limakalvon sijaan.

6.2 Kasvistanolien vaikutus suolistokasvaimien muodostumiseen ja β -kateniinin fosforylaatioon

Kasvistanolit ovat rakenteeltaan kolesterolin kaltaisia yhdisteitä, joita on kasvikunnan tuotteissa. Kiinnostus kasvistanoleja kohtaan heräsi, kun niiden havaittiin vähentävän veren LDL-kolesterolipitoisuutta (engl. low density lipoprotein) estämällä kolesterolin imeytymistä ruoansulatuskanavasta (ks. Law 2000). Myöhemmin markkinoille on myös tullut kolesterolia alentavia kasvistanoleja sisältäviä funktionaalisia elintarvikkeita (ks. Law 2000). Vaikka kasvistanolien vaikutusta veren LDL-kolesterolipitoisuuteen on tutkittu paljon, niiden vaikutusta paksusuolisyövän muodostumiseen ei ole aiemmin tutkittu.

6.2.1 Kasvistanolien vaikutus suolistokasvaimiin

Kasvistanoliryhmällä oli tilastollisesti merkitsevästi enemmän suolistokasvaimia kuin kontrolliryhmällä ($p=0,002$). Tutkimuksia kasvistanolien vaikutuksesta paksusuolisyöpään ei ole aiemmin tehty, vaikka kasvisterolien merkitystä paksusuolisyöpään on tutkittu. Kasvistanolitutkimuksen tulosta tukee Norménin ym. (2001) hollantilainen tapaus-verrokkitutkimus, jossa suuri kampesterolin ja stigmasterolin saanti lisäsi paksusuolisyövän riskiä miehillä. Kaikki aikaisemmat tutkimukset eivät kuitenkaan tue käsitystä, että kasvisterolit edistävät paksusuolisyöpää. β -sitosterolin ja fytosterolien on havaittu ehkäisevän paksusuolisyövän kehittymistä karsinogeenialtistuksen saaneilla hiiriillä (Raicht ym. 1980, Janezic & Rao 1992).

6.2.2 Kasvistanolien vaikutus β -kateniiniin ja sen fosforylaatioon

Kasvistanoliryhmällä oli tilastollisesti merkitsevästi enemmän β -kateniinia suoliston limakalvonäytteissä kuin kontrolliryhmällä ($p=0,043$), mikä on yhtenevä sen kanssa, että β -kateniinin säätelyn häiriintyminen edistää suolistosyövän kehittymistä. Kasvistanoliryhmän suurentunut β -kateniinipitoisuus viittaa siihen, että β -kateniinin hajottamisen vähentyminen on lisännyt β -kateniinin määrää (ks. MacDonald ym. 2009).

Kasvistanoliryhmän hiirillä β -kateniinia oli myös tumassa merkitsevästi enemmän kuin kontrolliryhmällä ($p=0,043$). Tämän perusteella voidaan päätellä, että kasvistanoliryhmällä β -kateniinin siirtyminen tumaan oli lisääntynyt. Tulosta tukee Herterin ym. (1999) tutkimus, jonka

mukaan β -kateniinin kerääntyminen tumaan saattaa olla ensimmäinen vaihe syövän kehittymiselle. Tumassa β -kateniini edistää kohdegeenien ilmentymistä, mikä ehkäisee solujen apoptoosia ja erilaistumista sekä lisää niiden jakautumista (ks. Brabletz ym. 2005, Clevers 2006). Sen seurauksena villuksessa sijaitsevat välivahvistinsolut jäävät kryptan kaltaisiksi erilaistumattomiksi soluiksi, jotka eivät käy läpi ohjelmoitua solukuolemaa. Kryptan rakenne muuttuu ja erilaistumattomia soluja kerääntyy villukseen, mikä johtaa suolistokasvaimen muodostumiseen. Tässä tutkimuksessa β -kateniinin siirtyminen tumaan onkin saattanut edistää suolistosyövän kehittymistä kasvistanolihiirillä lisääntyneen β -kateniinin kohdegeenien ilmentymisen myötä (ks. Radtke & Clevers 2005).

Fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinia oli enemmän kasvistanoliryhmällä verrattuna kontrolliryhmään, vaikka fosfo-Ser552- β -kateniini ei aivan saavuttanut tilastollista merkitsevyyttä ($p=0,077$). Tähän on syynä suuri hajonta, mikä voi osittain johtua mittausteknisistä syistä, sillä fosfo-Ser552- β -kateniinin mittaamisessa muodostui enemmän taustaa kuin fosfo-Ser675- β -kateniinin määrittämisessä (ks. kappale 6.1). Taustan muodostuminen on voinut vaikeuttaa todellisten erojen havaitsemista fosfo-Ser552- β -kateniinin osalta, ja sen vuoksi fosfo-Ser552- β -kateniini on todennäköisesti biologiselta merkittävyydeltään samaa luokkaa kuin fosfo-Ser675- β -kateniini. Kasvistanoliryhmällä β -kateniinin fosforyloituminen seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä on voinut edistää kiihtynyttä suolistokasvaimien muodostumista lisäämällä β -kateniinin määrää ja edistämällä sen siirtymistä tumaan (He ym. 2007, Li ym. 2012, Rey ym. 2012).

Tässä tutkimuksessa β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä voi ainakin osittain selittää kasvistanoliryhmän suurempaa β -kateniinipitoisuutta kontrolliryhmään nähden. Solulinjoilla tehtyjen tutkimusten mukaan fosfaattiryhmän liittyminen seriini675-aminohappotähteeseen vähentää β -kateniinin hajottamista ehkäisemällä ubikitiinien liittymistä β -kateniiniin (Hino ym. 2005, Li ym. 2012, Zhu ym. 2012). Ubikitiinien liittyminen β -kateniiniin antaa solulle käskyn siirtää β -kateniini proteasomiin hajotettavaksi (ks. MacDonald ym. 2009).

β -kateniinin lisääntynyt fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä voi taas osittain selittää kasvistanoliryhmän suurentunutta β -kateniinin määrää tumassa. Phelps ym. (2009) mukaan APC-mutaation aiheuttama lisääntynyt β -kateniinin määrä ei välttämättä saa aikaan β -

kateniinin siirtymistä tumaan, vaan muita muutoksia täytyy tapahtua β -kateniinin toimintaa säätelevissä tekijöissä. β -kateniinin fosforylaatio seriini552-aminohappotähteestä onkin saattanut vaikuttaa β -kateniinin sijoittumiseen solussa, sillä solukokeissa β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä edistää β -kateniinin siirtymistä tumaan (He ym. 2007, Fang ym. 2007, Lee ym. 2010). β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä lisää β -kateniinin kykyä sitoutua proteiinien sijaintia solussa säätelevään 14-3-3 ζ -proteiiniin (Fang ym. 2007). Tämä saattaa selittää sen, minkä vuoksi β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä edistää β -kateniinin siirtymistä tumaan.

Tuman sykliini D1 korreloi β -kateniinin ja sen fosforylaatiomuotojen (Ser552 ja Ser675) kanssa (ks. kuva 20). Kasvistanoliryhmällä oli enemmän solun jakautumista edistävää tuman sykliini D1 -proteiinia kuin kontrolliryhmällä (ks. kuva 21B). Tässä tutkimuksessa lisääntynyt β -kateniinin määrä ja sen fosforyloituminen seriini675- ja seriini552-aminohappotähteistä on voinut edistää sykliini D1:n ilmentymistä, sillä vahvaa näyttöä on saatu siitä, että β -kateniini ja sen fosforyloituminen seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä edistävät sykliini D1:n ilmentymistä (ks. Clevers ym. 2006, Zhao ym. 2010, Zhu ym. 2012). Tuman sykliini D1:n voi vaikuttaa suolistosyövän kehittymiseen, sillä noin kolmasosassa ihmisen adenoomanäytteistä tuman sykliini D1 -pitoisuudet ovat suurempia verrattuna normaaleihin paksusuolen limakalvon näytteisiin (Arber ym. 1996). Suuria tuman sykliini D1-pitoisuuksia on havaittu myös Apc^{Min} -hiirien suolistokasvaimien kudoksenäytteissä verrattuna terveisiin limakalvon näytteisiin (Zhang ym. 1997).

β -kateniini ja sen fosforyloituneet muodot (Ser552 ja Ser675) korreloivat myös Akt:n kanssa (ks. kuva 18). Akt:a oli enemmän kasvistanolia saaneilla hiirillä verrattuna kontrollihiiriin (ks. kuva 21C). Dihlmannin ym. (2005) tutkimuksessa Akt-proteiinia koodaavaa *AKT1*-geeniä pystyttiin ilmentämään β -kateniini/TCF4-kompleksin välityksellä ihmisten paksusuolisyövän solunäytteissä. Roy tutkimusryhmineen (2002) havaitsi Akt:n liiallisen tuottamisen olevan yhteydessä paksusuolisyövän kehittymiseen. Heidän tutkimuksessaan Akt:n määrä oli suuri 57 %:ssa paksusuolisyöpäpotilaiden kasvaimien näytteissä. Akt saattaa edistää suolistosyöpää ehkäisemällä apoptoosia (ks. Brazil ym. 2002). Tässä tutkimuksessa kasvistanolihiirillä lisääntynyt β -kateniinin määrä ja sen fosforyloituminen seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä ovat voineet edistää Akt:n ilmentymistä. Vaikka toisaalta on mahdollista, että vuorovaikutus menee

toisinpäin eli että Akt-reitti on edistänyt suolistosyövän kehittymistä aktivoimalla Wnt-reittiä ja muita suolistosyöpää edistäviä reittejä (ks. kappale 6.2.4.2).

6.2.3 Fosfo- β -kateniinipitoisuuksien yhteys kasvaimien lukumäärään ja kokoon kasvistanolitutkimuksen hiirillä

Kasvistanolikokeessa β -kateniini ja sen fosforyloituneet muodot (Ser552 ja Ser675) eivät korreloineet tilastollisesti merkitsevästi suolistokasvaimien lukumäärän kanssa (ks. kuvat 16B ja 16C). Tämän perusteella voidaan päätellä, ettei β -kateniinilla ja sen fosforyloituneilla muodoilla ole suoraa, lineaarista yhteyttä suolistokasvaimien lukumäärään. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että suolistosyövän kehittymiseen on voinut β -kateniinin lisäksi vaikuttaa muita tekijöitä. Kasvistanoliryhmän suolistokasvaimien muodostumiseen osallistuvia signaalireittejä ja niiden vuorovaikutusta Wnt-reitin kanssa käsitellään kappaleessa 6.2.4.

Suolistokasvaimien koossa ei ollut eroa ryhmien välillä ($p=0,383$). Lisäksi suolistokasvaimien koko ei korreloinut β -kateniinin fosforylaatiomuotojen (Ser675 ja Ser552) ja β -kateniinin suhteen kanssa kasvistanolitutkimuksen hiirillä (ks. sivu 45). Koska suolistokasvaimien koossa ei ollut eroa ryhmien välillä, kasvistanolidieetti ei edistänyt suolistosyövän etenemistä, vaan lähinnä kiihdytti suolistokasvaimien muodostumista syövän alkuvaiheessa. Näin ollen β -kateniini ja sen fosforyloituminen seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä ei vaikuttanut suolistosyövän etenemiseen tässä tutkimuksessa.

Yhteenvetona voidaan sanoa, että kasvistanolidieetti mahdollisesti edisti suolistokasvaimien muodostumista lisäämällä β -kateniinin määrää ja sen fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä. β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä todennäköisesti ehkäisi β -kateniinin hajottamista, mikä lisäsi β -kateniinin määrää sytosolissa. β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä saattoi edistää vapaana sytosolissa olevan β -kateniinin siirtymistä tumaan. Tumassa β -kateniini näytti osallistuvan kiihtyneeseen suolistokasvaimien muodostumiseen lisäämällä sykliini D1:n ja Akt:n ilmentymistä.

6.2.4 Wnt-reitin ja muiden signaalireittien vuorovaikutus kasvistanolidieettiä saaneilla hiirillä

6.2.4.1 Wnt- ja EGFR-reitti

β -kateniini ja sen fosforyloituneet muodot (Ser675 ja Ser552) korreloivat fosfo-EGFR-pitoisuuksien kanssa (ks. kuva 17). Kasvistanoliryhmän hiirillä oli enemmän fosfo-EGFR:ä verrattuna kontrolliryhmän hiiriin (ks. kuva 21A). Kasvistanolia saaneilla hiirillä EGFR-reitti onkin saattanut aktivoida Wnt-reitin toimintaa. Civenni ym. (2003) tutkimuksessa rintasyövän HC11-epiteelisoluissa Wnt- ja EGFR-reitit olivat aktivoituneet samanaikaisesti ja EGFR-reitin inhiboiminen heikensi Wnt-reitin aktiivisuutta.

Kasvistanoliryhmällä lisääntynyt suolistokasvaimien muodostuminen on voinut saada alkunsa kasvistanolin aikaansaamasta solukalvon kolesterolin epätasapainosta. Kasvistanoli on saattanut syrjäyttää kolesterolia solukalvolta (Mora ym. 1999, Ratnayake ym. 2000), minkä seurauksena solukalvon kolesterolin tasapainon häiriintyminen on aktivoinut paksusuolisyöpää edistävän EGFR-reitin (Ringerike ym. 2002).

EGFR-reitti on voinut lisätä Wnt-reitin toimintaa tyrosiinikinaasireittien kuten PI3K/Akt- ja PAK1-reittien välityksellä (Galisteo ym. 1996, Fang ym. 2007). Kasvistanolihiirillä K-RAS/RAC/PAK1-reitti on saattanut olla aktiivinen, vaikka sitä ei ole tutkittu tässä aineistossa. Zhun ym. (2012) tutkimuksessa PAK1 edisti β -kateniinin fosforyloitumista seriini675-aminohappotähteestä, mikä ehkäisi β -kateniinin hajottamista ja lisäsi β -kateniinivälitteisten geenien ilmentymistä SW480 - paksusuolisyövän solulinjassa. Tässä tutkimuksessa K-RAS/RAC/PAK1-reitin mahdollinen aktivoituminen on voinut edistää β -kateniinin fosforyloitumista seriini675-aminohappotähteestä kasvistanolia saaneilla hiirillä, minkä seurauksena β -kateniinin hajottaminen on vähentynyt ja sen kohdegeenien ilmentyminen lisääntynyt. Seuraavassa kappaleessa pohditaan PI3K/Akt-reitin vaikutusta β -kateniinin toimintaan ja suolistosyövän kehittymiseen kasvistanolihiirillä.

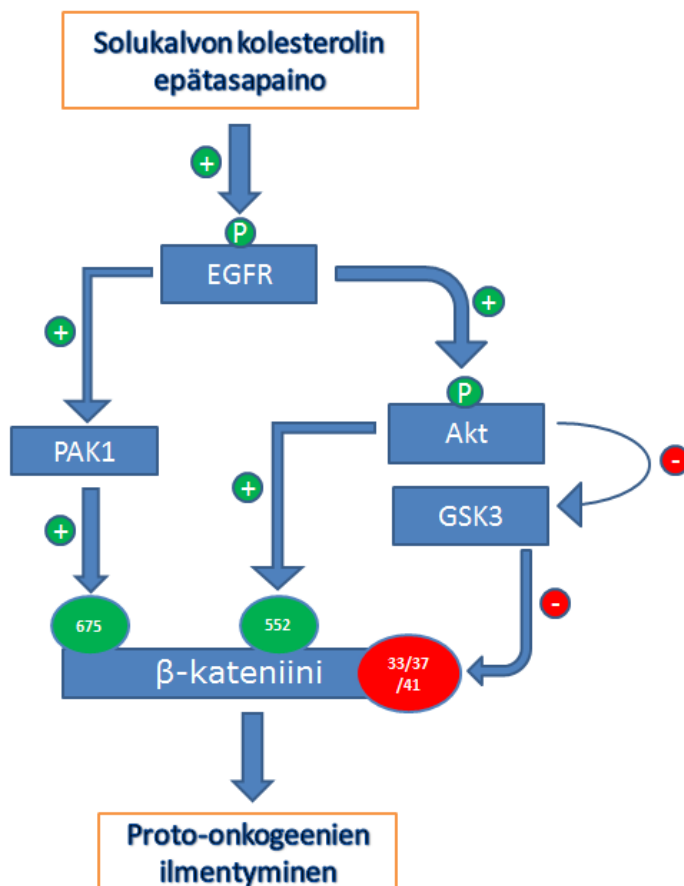
6.2.4.2 Wnt- ja Akt-reitti

β -kateniini ja sen fosforyloituneet muodot (Ser675 ja Ser552) korreloivat fosfo-Akt-pitoisuuksien kanssa (ks. kuva 19). Tämä voi viitata siihen, että β -kateniinia on ainakin osaksi aktivoitu Akt-reitin välityksellä. Akt-reitti edistää Wnt-reitin toimintaa ehkäisemällä (1) β -kateniinin hajottamista ja (2) edistämällä β -kateniinin siirtymistä tumaan (Fang ym. 2007, Lee ym. 2010). Akt-reitti ehkäisee GSK3:n toimintaa (Fang ym. 2007). Tämä vähentää β -kateniinin N-terminaalisen pään fosforyloitumista, mikä estää β -kateniinin hajottamista (ks. MacDonald ym. 2009). Lisäksi Akt fosforyloi β -kateniinin seriini552-aminohappotähteestä (Fang ym. 2007, Lee ym. 2010). Tämä lisää β -kateniinin affiniteettia 14-3-3 ζ -proteiinia kohtaan, mikä saattaa selittää sen, miksi β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä lisää β -kateniinin siirtymistä tumaan (Brunet ym. 2002, Fang ym. 2007).

Tässä tutkimuksessa kasvistanolihiirillä Akt-reitti on voinut lisätä β -kateniinin määrää ja sen fosforyloitumista seriini552-aminohappotähteestä. Akt-reitti inhiboi β -kateniinin hajottamiseen osallistuvan GSK3:n ja lisää β -kateniinin fosforyloitumista seriini552-aminohappotähteestä, joka on voinut saada aikaan β -kateniinin kerääntymisen tumaan. Lisääntynyt β -kateniinin määrä ja β -kateniinin siirtyminen tumaan on todennäköisesti lisännyt proto-onkogeenien ilmentymistä ja sitä kautta edistänyt kiihtynyttä suolistokasvaimien muodostumista kasvistanolihiirillä.

6.2.4.3 Yhteenveto Wnt-reitin kanssa vuorovaikutuksessa olevista signaalireiteistä kasvistanolidieettiä saaneilla hiirillä

Seuraavana on yhteenveto siitä, miten tutkitut signaalireitit ovat mahdollisesti vaikuttaneet suolistokavaimien muodostumiseen kasvistanolia saaneilla hiirillä (ks. kuva 31). Kasvistanolidieetti saa aikaan solukalvon kolesterolin epätasapainon, minkä seurauksena EGFR-reseptori fosforyloituu. Fosfo-EGFR säätelee β -kateniinin toimintaa Akt- ja PAK1-reittien välityksellä. Akt-reitti lisää β -kateniinin fosforyloitumista seriini552-aminohappotähteestä, mikä saa aikaan β -kateniinin kerääntymisen tumaan. Lisäksi Akt-reitti estää GSK3:n toiminnan, mikä vähentää β -kateniinin fosforyloitumista treoniini41-, seriini37- ja seriini33-aminohappotähteistä ja sitä kautta ehkäisee β -kateniinin hajottamista. PAK1-reitti lisää β -kateniinin fosforyloitumista seriini675-aminohappotähteestä, minkä seurauksena β -kateniinin hajottaminen vähenee entisestään. Nämä muutokset edistävät suolistokasvaimien muodostumista lisäämällä solun jakautumista edistävän sykliini D1:n ja ohjelmoitua solukuolemaa ehkäisevän Akt:n ilmentymistä.



Kuva 31. Kasvistanolidieetin aikaansaama Wnt-reitin reitin aktivoituminen.

6.3 Länsimaisen dieetin vaikutus suolistokasvaimien muodostumiseen ja β -kateniinin fosforylaatioon

Ns. länsimaisen ruokavalion yleensä ajatellaan olevan energiatiheä ruokavalio, joka sisältää paljon punaista lihaa, sokeria sisältäviä ruokia, runsasrasvaisia ruokia ja puhdistettua viljaa. Ravintosisällöltään ns. länsimainen ruokavalio sisältää paljon rasvaa, etenkin tyydyttynyttä rasvaa, sokeria, suolaa sekä vähän kuitua, kivennäisaineita ja vitamiineja. Länsimaisen ruokavalion on osoitettu lisäävän paksusuolen kasvaimien muodostumista hiirimalleissa (Newmark ym. 2001).

6.3.1 Länsimaisen dieetin vaikutus β -kateniiniin ja sen fosforylaatioon

Länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä oli tilastollisesti merkitsevästi enemmän suolistokasvaimia kuin kontrollidieettiä saaneilla hiirillä ($p=0,002$). Tulosta tukevat lukuisat aikaisemmat tutkimukset. Randi ym. (2010) kiteyttävätkin epidemiologisia tutkimuksia käsittelevässä kirjallisuuskatsauksessaan länsimaisen ruokavalion olevan yhteydessä lisääntyneeseen paksusuolisyöpään. Hiirillä tehdyt tutkimukset osoittavat länsimaisen dieetin edistävän paksusuolisyöpää. Rision ym. (1996) tutkimuksessa länsimaista dieettiä syötettiin terveille C57/BL6J-hiirille kahden vuoden ajan. Dieetti sisälsi paljon rasvaa ja fosfaattia sekä vähän kalsiumia ja D-vitamiinia. Tutkimuksessa hiirille muodostui haitallisia rakennemuutoksia kryptoihin, mutta muutokset eivät edenneet suolistokasvaimiksi tai pahanlaatuisiksi kasvaimiksi saakka. Länsimaisen dieetin syöttäminen APC-geeniltään mutatoituneille Apc1638-hiirille lisäsi pahanlaatuisten kasvaimien ja invaasisten kasvaimien kehittymistä ohutsuolessa (Yang ym. 1998). Tutkimuksessa länsimainen dieetti sisälsi paljon rasvaa sekä vähän kalsiumia ja D-vitamiinia. Newmark tutkimusryhmineen (2001) muutti hiirille syötettävää länsimaista dieettiä vastaamaan paremmin tavanomaisen länsimaisen väestön ruokavaliota. Heidän kehittämässään länsimaisessa dieetissä on paljon rasvaa sekä vähän kuitua, kalsiumia, D-vitamiinia, koliinia, metioniinia ja foolihappoa. Länsimaisen dieetin syöttäminen 12 – 18 kuukauden ajan sai aikaan suolistokasvaimien ja pahanlaatuisten kasvaimien kehittymisen ohut- ja paksusuoleen terveillä C57/BL6-hiirillä. Newmarkin ym. (2001) tutkimus on ensimmäinen, jossa länsimainen dieetti aiheutti suolistosyövän terveille hiirille ilman karsinogeenialtistusta.

Tässä tutkimuksessa länsimaista dieettiä saaneella ryhmällä oli systemaattisesti enemmän β -kateniinia ja β -kateniinin fosforylaatiomuotoja (Ser552 ja Ser675) kuin kontrolliryhmällä, vaikka erot eivät saavuttaneet tilastollista merkitsevyyttä (ks. kuva 22). β -kateniinituloksissa on suuri hajonta ja näyttää siltä, että osa hiiristä on reagoinut länsimaiseen dieettiin voimakkaammin kuin toiset, joten otoskoko on jäänyt liian pieneksi tilastollisesti merkitsevien erojen havaitsemiseksi. On mahdollista, että ainakin osalla hiiristä länsimainen dieetti on edistänyt suolistokasvaimien muodostumista β -kateniinin välityksellä. Ajatusta tukee Kimin ym. (2010) tutkimus, jossa länsimainen dieetti lisäsi suolistokasvaimien lukumäärää ja insidenssiä sekä edisti β -kateniinin kerääntymistä syöpäsolujen ja makrofagien tumaan karsinogeenialtistuksen saaneilla BALB/c-uroshiirillä. BALB/c-uroshiirille syötettiin neljän viikon ajan länsimaista dieettiä, joka sisälsi paljon rasvaa ja fosfaattia sekä vähän D-vitamiinia ja kalsiumia.

6.3.2 Fosfo- β -kateniinipitoisuuksien yhteys kasvaimien lukumäärään ja kokoon länsimainen dieetti –tutkimuksen hiirillä

Kun kontrolliryhmän ja länsimaista dieettiä saaneen ryhmän tulokset analysoitiin erikseen, kontrolliryhmän β -kateniini ja sen fosforyloituneet muodot (Ser552 ja Ser675) korreloivat suolistokasvaimien lukumäärän kanssa (ks. kuva 25). Sen sijaan länsimaista dieettiä saaneella ryhmällä ne eivät korreloineet (ks. kuva 26).

Kontrolliryhmän tulos tukee oletusta siitä, että Apc^{Min} -hiirimallissa suolistosyövän kehittyminen alkaa β -kateniinin säätelyjärjestelmän häiriintymisestä: Mitä enemmän suolistokasvaimia on suolistossa, (1) sitä suurempi on β -kateniinipitoisuus ja (2) sitä enemmän β -kateniinia on fosforyloitu proto-onkogeenien ilmentymistä edistävästä Ser675- ja Ser552-aminohappotähteistä (ks. Lustig & Behrens 2003, He ym. 2007, Li ym. 2012, Rey ym. 2012). Sen seurauksena Wnt-reitti aktivoituu liikaa, jolloin proto-onkogeenien ilmentyminen edistää suolistosyövän kehittymistä ehkäisemällä apoptoosia ja solujen erilaistumista sekä lisäämällä solujen jakautumista (ks. Brabletz ym. 2005, ks. Clevers 2006).

Suolistosyövän kehittyminen länsimaista dieettiä saaneella ryhmällä on näyttänyt olevan monimutkainen ilmiö, johon on osallistunut Wnt-reitin lisäksi muita signaalireittejä, sillä kokonais-, fosfo-Ser552- ja fosfo-Ser675- β -kateniinilla ei ollut lineaarista yhteyttä suolistokasvaimien lukumäärän kanssa tässä ryhmässä. Päätelmää tukee myös se, että

länsimainen dieetti koostuu monesta suolistosyövälle altistavasta riskitekijästä (Newmark ym. 2001). Apc^{Min} -hiiren suolistosyövän kehittyminen perustuu kuitenkin β -kateniinin säätelyn häiriintymiseen (ks. Lustig & Behrens 2003), joten voidaan ajatella β -kateniinin lievästi suurentuneella määrällä ja β -kateniinin fosforyloitumisella seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä olevan merkitystä kiihtyneeseen suolistokasvaimien muodostumiseen länsimaista dieettiä saaneella ryhmälläkin. β -kateniini ja sen fosforyloituneet muodot (Ser552 ja Ser675) korreloivat Akt:n kanssa (ks. kuva 30). β -kateniinin määrän lisääntyminen ja sen fosforyloituminen seriini675- ja seriini552-aminohappotähteistä onkin voinut edistää Akt:n ilmentymisen länsimaista dieettiä saaneilla hiiriillä. Tulosta tukee Dihlmannin ym. (2005) tutkimus, jossa β -kateniini lisäsi Akt:tä koodaavan geenin ilmentymistä.

Tässä tutkimuksessa suolistokasvaimien koossa ei ollut eroa dieettiryhmien välillä eivätkä β -kateniini ja β -kateniinin fosforylaatiomuodot (Ser552 ja Ser675) korreloineet suolistokasvaimien keskimääräisen koon kanssa. Näiden tulosten perusteella voidaan päätellä, ettei länsimainen dieetti vaikuttanut suolistosyövän etenemiseen, ja sen vuoksi β -kateniinin määrällä ja sen fosforyloitumisella ei ollut merkitystä suolistokasvaimien koon kannalta.

Voidaan siis ajatella, että tässä tutkimuksessa β -kateniinin määrällä ja fosforyloitumisella seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä on erilainen merkitys suolistokasvaimien muodostumisessa kontrolli- ja länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä: Kontrollihiirillä β -kateniinipitoisuudet olivat suoraan, lineaarisesti yhteydessä muodostuneiden suolistokasvaimien lukumäärään, kun taas länsimaista dieettiä saaneilla hiiriillä näin ei ollut. Tämä todennäköisesti johtuu siitä, että länsimaisessa dieetissä on monia suolistosyövälle altistavia tekijöitä, jonka seurauksena suolistosyövän kehittymiseen on osallistunut monia signaalireittejä Wnt-reitin ohella. Tässä tutkimuksessa länsimainen dieetti ei kiihdyttänyt suolistokasvaimien koon kasvua, ja sen vuoksi voidaan myös päätellä, ettei β -kateniinin määrä tai β -kateniinin fosforyloituminen seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä vaikuttanut suolistosyövän etenemiseen länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä.

6.3.3 Länsimaisen dieetin osatekijöiden vaikutus β -kateniiniin

Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että monet länsimaisen dieetin ravintotekijät vaikuttavat suolistosyövän kehittymiseen ja etenemiseen sekä β -kateniinin määrään, sijoittumiseen solussa ja/tai kykyyn edistää proto-onkogeenien ilmentymistä. Näitä ravintotekijöitä ovat mm. ruokavalion runsasrasvaisuus, suuri tyydyttyneen rasvan osuus kokonaisrasvasta sekä kalsiumin, D-vitamiinin ja folaatin pieni määrä ruokavaliossa (ks. taulukko 3).

Runsasrasvainen ruoka saattaa aktivoida Wnt-reittiä, sillä 45 E% runsasrasvainen maissiöljydieetti lisäsi tuman β -kateniinin määrää ja β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä suoliston kasvainkudoksessa verrattuna 13,5 E% vähärasvaiseen maissiöljydieettiin ksenografti-hiirimallissa (ks. taulukko 3, Tang ym. 2012). Tangin ym. (2012) tutkimuksessa runsasrasvaisen dieetin aikaansaama Wnt-reitin aktivoituminen näytti edistävän suolistosyövän etenemistä, mutta ei sen alkuvaihetta, sillä runsasrasvainen dieetti vaikutti suolistokasvaimien kokoon, mutta ei niiden määrään. Yhteenvetona voidaan sanoa, ettei Tangin ym. (2012) tutkimuksen perusteella voida suoraan vetää johtopäätöksiä siitä, miten tässä työssä länsimaisen dieetin suuri rasvan määrä on vaikuttanut β -kateniinin määrään ja fosforyloitumiseen seriini675- ja seriini552-aminohappotähteistä Apc^{Min}-hiirillä. Tämä johtuu siitä, että Tangin ym. (2012) tutkimuksessa β -kateniinia määritettiin kasvainkudoksen näytteistä, kun taas tässä tutkimuksessa näytteet on otettu normaalista ohutsuolen limakalvosta.

Rasvan laadulla näyttäisi olevan myös vaikutusta suolistosyövän kehittymiseen ja mahdollisesti sen etenemiseen sekä β -kateniinin määrään ja sen kohdegeenien ilmentymiseen. Fujisen ym. (2007) tutkimuksessa pitkäaikainen ns. tyydyttynyt rasvahappo -dieetti (10 % naudan tali) ja ns. omega-6-rasvahappodieetti (10 % maissiöljy) lisäsivät suolistokasvaimien insidenssiä ja määrää verrattuna kontrollidieettiin Sprague-Dawley uroshiirillä. Lisäksi näitä tutkimusdieettejä saaneilla hiirillä oli enemmän sytosolin β -kateniinia ja β -kateniinin kohdegeenejä oli ilmennetty enemmän normaalissa suoliston kudoksessa verrattuna kontrolliryhmän hiiriin. Sen sijaan samassa tutkimuksessa ns. kertatyydyttymätön rasvahappo -dieetti (10 % oliiviöljy) ja ns. omega-3-rasvahappodieetti (10 % kalaöljy) vähensivät suolistokasvaimien insidenssiä ja määrää. Nämä tutkimusdieetit eivät kuitenkaan vaikuttaneet β -kateniinin määrään tai sen kohdegeenien

ilmentymiseen verrattuna kontrolliryhmään. Bosen ym. (2007) tutkimuksessa amerikkalaisen dieetin rasvan osittainen korvaaminen kalaöljyllä Apc^{Min} -hiirillä vähensi β -kateniinin määrää ohutsuolen kasvainkudoksessa, mutta ei vaikuttanut suolistokasvaimien lukumäärään tai kokoon verrattuna rasvahappokoostumukseltaan amerikkalaista dieettiä saaneisiin Apc^{Min} -hiiriin. Finin ym. (2010) tutkimuksessa omega-3-rasvahappojen osuuden lisääminen kokonaisrasvasta vähensi suolistokasvaimien määrää ja kokoa sekä tuman β -kateniinin määrää dysplastisessa kudoksessa Apc^{Min} -hiiriillä. Näiden tutkimusten perusteella voidaan päätellä, että tässä työssä länsimaisen dieetin suuri tyydyttyneiden rasvahappojen määrä on voinut edistää kiihtynyttä suolistokasvaimien muodostumista sekä lisätä β -kateniinin määrää ja fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä.

Solu- ja eläinmalleilla tehdyt tutkimukset viittaavat siihen, että kalsium ehkäisee β -kateniinin fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä ja vähentää β -kateniinin määrää tumassa, mikä ehkäisee proto-onkogeenien ilmentymistä (Chakrabarty ym. 2003 ja 2005, Rey ym. 2012). Tämän seurauksena kalsium näyttäisi ehkäisevän suolistosyövän kehittymistä vähentämällä solujen jakautumista ja lisäämällä solujen erilaistumista (Chakrabarty ym. 2003 ja 2005, Rey ym. 2012). Chakrabartyn ym. (2003 ja 2005) tutkimuksissa kalsiumkäsittely ehkäisi paksusuolisyöpäsolujen jakautumista ja lisäsi niiden erilaistumista samalla, kun TCF-kohdegeenien ilmentyminen vähentyi. Chakrabartyn ym. (2005) mukaan kalsiumkäsittelyn aikaansaama kalsiumreseptorin aktivoituminen saattoi vähentää TCF-kohdegeenien ilmentymistä. Tulosta tukee Reyn ym. (2012) tutkimus, jossa kalsiumreseptoria ilmentämättömillä hiirillä oli pidempi krypta, solut jakautuivat nopeammin ja β -kateniinia kerääntyi enemmän tumaan kuin kalsiumreseptoria ilmentävillä hiirillä. Samassa tutkimuksessa kalsiumreseptoria ilmentävien NCMiCaSR-solujen käsittely kalsiumioneilla vähensi β -kateniinin fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä, mikä ehkäisi β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä. Kaikki tutkimukset eivät kuitenkaan tue sitä, että kalsium ehkäisee suolistosyövän kehittymistä säätelemällä β -kateniinia. Umarin ym. (2003) tutkimuksessa riittävä kalsiumin saanti ei vaikuttanut β -kateniinin määrään kryptassa, vaikka se ehkäisi kryptan pitenemistä ja solujen jakautumista Swiss-Webster –hiirillä verrattuna liian vähän kalsiumia saaneisiin hiiriin. Näiden tulosten perusteella kalsiumin riittävä saanti voi ehkäistä suolistosyövän kehittymistä aktivoimalla kalsiumreseptoria, jonka seurauksena β -kateniinin kohdegeenien ilmentyminen ja β -kateniinin fosforyloituminen seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä vähentyy. Tässä

työssä länsimaisen dieetin pieni kalsiumin määrä on siis saattanut edistää suolistosyövän kehittymistä lisäämällä β -kateniinin määrää ja sen fosforyloitumista seriini675- ja seriini552-aminohappotähteistä, minkä seurauksena suolistosyövän kehittymistä edistävien proto-onkogeenien ilmentyminen on lisääntynyt.

D₃-vitamiinin biologisesti aktiivinen muoto, kalsitrioli, saattaa ehkäistä suolistosyövän etenemistä β -kateniinin välityksellä (Pálmer ym. 2001). Kalsitrioli voi myös ehkäistä suolistosyövän kehittymistä, mutta se todennäköisesti tapahtuu β -kateniinista riippumattomalla tavalla (Chakrabarty ym. 2005). Pálmerin ym. (2001) tutkimuksessa paksusuolisyöpäsolujen käsittely kalsitriolilla edisti solujen erilaistumista ja ehkäisi β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä. Kalsitriolikäsittely lisäsi β -kateniinin sitoutumista D-vitamiinireseptoriin ja sen siirtymistä tumasta solukalvolle, mikä on voinut estää β -kateniinin sitoutumista TCF-transkriptiotekijään ja sen seurauksena vähentää β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä (Pálmer ym. 2001). Chakrabartyn ym. (2005) tutkimuksessa taas kalsitriolikäsittely hidasti TBS-paksusuolisyöpäsolujen jakautumista ja edisti niiden erilaistumista, mutta ei vähentänyt TCF-transkriptiovälitteistä geenien ilmentymistä. Yhteenvedona voidaan sanoa, että kalsitrioli ehkäisee suolistosyövän etenemistä estämällä β -kateniinin kohdegeenien ilmentymistä. Lisäksi se näyttäisi ehkäisevän suolistosyövän kehittymistä β -kateniinista riippumattomalla tavalla. Tässä työssä länsimaisen dieetin pieni D₃-vitamiinin määrä on voinut edistää suolistosyövän kehittymistä, mutta se on todennäköisesti vaikuttanut siihen muiden tekijöiden kuin β -kateniinin välityksellä.

Folaatin vaikutuksesta suolistosyöpään ja β -kateniinin toimintaan on saatu ristiriitaisia tuloksia. Yangin ym. (2008) tutkimuksessa riittävästi folaattia sisältävä länsimainen dieetti C57Bl/6-hiirillä ei vähentänyt suolistosyövän insidenssiä tai vaikuttanut β -kateniinin määrään ja sen kohdegeenien ilmentymiseen paksusuolen limakalvon epiteelisoluissa verrattuna niukasti folaattia sisältävää länsimaista dieettiä saaneisiin hiiriin. Sen sijaan Jaszewskin ym. (2004) interventiotutkimus antoi viitteitä siitä, että 5 mg/d folaattilisä ehkäisee suolistosyövän uusiutumista paksusuolisyöpäpotilailla. Tutkijat havaitsivat, että folaattilisä vähensi tuman β -kateniinin määrää ihmisten peräsuolen normaalin limakalvon kudoksenäytteissä. Jaszewskin ym. (2004) tutkimuksen tulokset eivät kuitenkaan ole verrattavissa tämän työ tuloksiin, sillä tutkimus antaa tietoa suolistosyövän uusiutumisesta, mutta ei sen ennaltaehkäisystä: Folaattilisä annettiin vasta sen jälkeen, kun paksusuoleen oli jo muodostunut suolistokasvaimia. Toiseksi tablettina

annetulla folaattilisällä ei välttämättä ole samanlaisia vaikutuksia suolistosyövän kehittymiseen ja etenemiseen kuin ruoassa luonnostaan olevalla folaatilla. Näiden kahden tutkimuksen perusteella näyttää siltä, ettei ravinnon folaatilla ole vaikutusta suolistosyövän kehittymiseen hiirillä, mutta folaattilisä saattaa ehkäistä suolistosyövän uusiutumista ihmisillä vähentämällä β -kateniinin määrää tumassa. Voidaan sanoa, ettei tässä työssä länsimaisen dieetin pienellä folaatin määrällä ole todennäköisesti ollut vaikutusta kiihtyneeseen suolistokasvaimien muodostumiseen, lisääntyneeseen β -kateniinin määrään ja sen fosforyloitumiseen seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä.

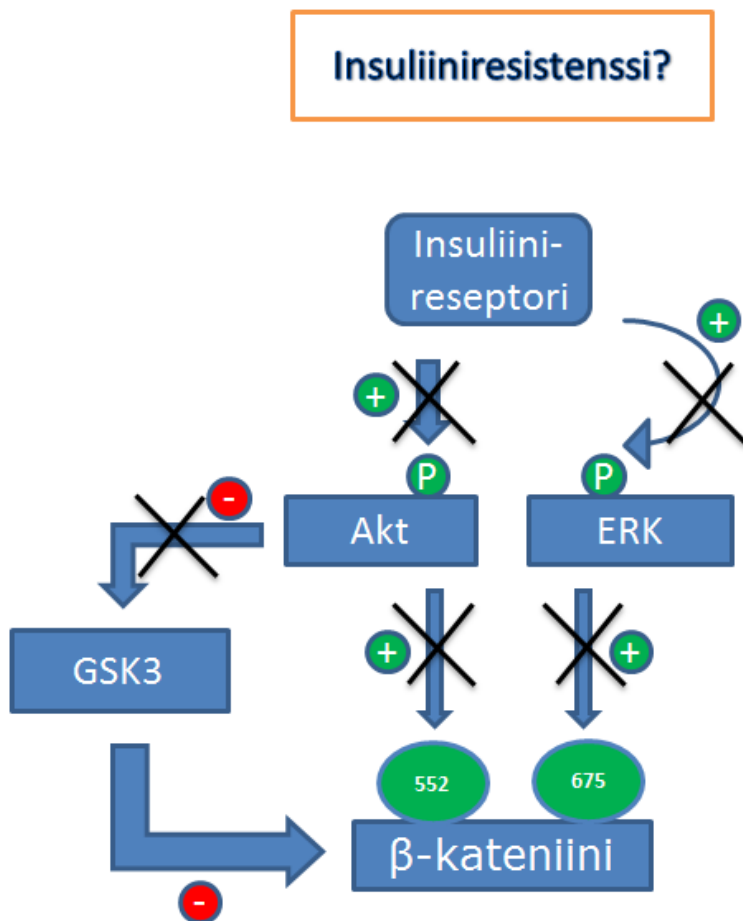
Yhteenvedona voidaan esittää, että tässä tutkimuksessa länsimaisen dieetin suuri tyydyttyneiden rasvahappojen määrä kokonaisrasvasta sekä pieni kalsiumin ja D_3 -vitamiinin määrä ovat todennäköisesti vaikuttaneet suolistosyövän kehittymiseen länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä. Suuri tyydyttyneiden rasvahappojen ja pieni kalsiumin määrä ovat voineet edistää suolistosyövän kehittymistä lisäämällä β -kateniinin määrää ja sen kohdegeenien ilmentymistä. Länsimaisen dieetin pieni kalsiumin määrä on todennäköisesti lisännyt β -kateniinin fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä. On myös mahdollista, että suuri tyydyttyneiden rasvahappojen määrä länsimaisessa dieetissä on edistänyt β -kateniinin fosforyloitumista näistä aminohappotähteistä, mutta rasvan laadun vaikutusta β -kateniinin aminohappotähteiden fosforylaatioon ei ole tutkittu. Tässä työssä länsimaisen dieetin pieni D_3 -vitamiinin määrä ei ilmeisesti lisännyt suolistosyövän kehittymistä β -kateniinin välityksellä, vaan muiden signaalireittien kautta. Näyttäisi siltä, ettei länsimaisen dieetin folaatin pienellä määrällä ollut vaikutusta hiirien suolistosyövän kehittymiseen, β -kateniinin määrään ja sen fosforyloitumiseen seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä.

6.3.4 Wnt-reitti ja insuliiniresistenssi

β -kateniini ja sen fosforylaatiomuodot (Ser552 ja Ser675) korreloivat käänteisesti fosfo-ERK:n ja Akt-reitin aktivaation kanssa länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä (ks. kuvat 28 ja 29). Lisäksi länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä oli vähemmän fosfo-ERK:ä sekä fosfo-Akt:n ja kokonais-Akt:n suhde oli pienempi kuin kontrollihiirillä (kuva 27A ja 27B). ERK- ja Akt-reittien inhiboituminen on voinut selittää sen, miksi kokonais-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinia ei ollut tilastollisesti merkitsevästi enemmän länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä kuin kontrollihiirillä. Ensinnäkin ne ovat keskeisiä signaalireittejä, jotka saavat aikaan β -kateniinin fosforyloitumisen seriini675- ja seriini552-aminohappotähteistä (Fang ym. 2007, Sun ym. 2009). Tällä hetkellä tiedetäänkin, että ainoastaan Akt- ja PKA-reitit saavat aikaan β -kateniinin fosforyloitumisen seriini552-aminohappotähteestä ja ERK-, PAK1- ja PKA-reitit β -kateniinin fosforyloitumisen seriini675-aminohappotähteestä (Taurin ym. 2006, Fang ym. 2007, Sun ym. 2009, Zhu ym. 2011). Toiseksi tämä on voinut vähentää β -kateniinin määrää, sillä β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä ehkäisee β -kateniinin hajottamista ja Akt inhiboi β -kateniinin hajottamiseen osallistuvan GSK3:n toimintaa (Hino ym. 2005, Fang ym. 2007, Li ym. 2012, Zhu ym. 2012).

Tässä tutkimuksessa on yllättävää, että länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä kasvainten kiihtynyt muodostuminen tapahtuu samanaikaisesti Akt- ja ERK-reittien inhiboitumisen kanssa. Yleensä ERK- ja Akt-signaalireitit liitetään suolistosyövän kehittymiseen (Roy ym. 2002, Fang & Richardson 2005). Yksi selitys tälle voi olla se, että länsimainen dieetti on saanut aikaan insuliiniresistenssin kehittymisen. Insuliiniresistenssi voi selittää Akt- ja ERK-reittien inhiboitumisen, sillä insuliini aktivoi Akt- ja ERK-reittejä (ks. Zoncu 2011). Tulosta tukee myös se, että insuliiniherkkyyden heikkeneminen näyttäisi vähentävän Akt-reitin toimintaa (ks. Zoncu 2011). Tosin insuliiniresistenssi on voinut itsenäisesti edistää suolistosyövän kehittymistä länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä, sillä Koohestanin ym. (1997 ja 1998) tutkimuksissa on havaittu, että ravinnon aikaansaama insuliiniresistenssi voi kiihdyttää suolistokasvaimien kehittymistä.

Näiden tulosten perusteella voidaan esittää, että länsimainen dieetti on saanut aikaan insuliiniresistenssin kehittymisen, mikä mahdollisesti selittää sen, miksi kokonais-, fosfo-Ser552- ja fosfo-Ser675- β -kateniinia ei ollut tilastollisesti merkitsevästi enemmän länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä kuin kontrollihiirillä (ks. kuva 32). Insuliiniresistenssi ehkäisee Akt- ja ERK-reittien toimintaa, mikä on voinut ehkäistä β -kateniinin fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä. Lisäksi tämä on voinut vähentää β -kateniinin määrää, sillä β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä ehkäisee β -kateniinin hajottamista ja Akt inhiboi β -kateniinin hajottamiseen osallistuvan GSK3:n toimintaa. Insuliiniresistenssi voi vaikuttaa suolistosyvän kehittymiseen β -kateniinista riippumattomalla tavalla.



Kuva 32. Insuliiniresistenssin vaikutus β -kateniinin määrään ja fosforyloitumiseen seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä

6.3.5 Yhteenveto länsimainen dieetti -tutkimuksesta

Länsimaisen dieetin aikaansaama kiihtynyt suolistokasvaimien kehittyminen on näyttänyt olevan monimutkainen tapahtumasarja. Länsimainen dieetti sisältää monia suolistosyövälle altistavia ravintotekijöitä kuten suuri energiatiheys, runsasrasvaisuus, suuri tyydyttyneiden rasvahappojen osuus kokonaisrasvasta sekä kalsiumin ja D₃-vitamiinin pieni määrä dieetissä. Dieetin monet suolistosyövälle altistavat ravintotekijät saattavat selittää sen, miksi suolistosyövän kehittymiseen on voinut vaikuttaa monia signaalireittejä, joilla on osin vastakkaisiakin vaikutuksia β -kateniinin määrään ja fosforyloitumiseen soluissa.

Koska Apc^{Min}-hiirillä suolistosyövän kehittyminen perustuu β -kateniinin säätelyn häiriintymiseen, voidaan myös tässä tutkimuksessa olettaa suurentuneella β -kateniinin määrällä ja sen fosforyloitumisella seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä olevan vaikutusta suolistosyövän kehittymiseen, vaikka erot eivät saavuttaneet tilastollisen merkitsevyyden rajaa. Analysoitaessa näytteitä Western blotting -menetelmällä havaittiin, että näytteiden välillä oli suuri hajonta, mikä heikentää tilastollisesti merkitsevien erojen havaitsemista. Toisaalta tämä myös viittaa siihen, että länsimainen dieetti on edistänyt suolistosyövän kehittymistä poikkeuksellisen monimutkaisella tavalla eikä kiihtynyttä suolistosyövän kehittymistä voida selittää ainoastaan yksittäisellä signaalireitillä. Näyttäisikin siltä, että länsimainen dieetti on voinut aktivoida signaalireittejä, jotka sekä (1) lisäävät β -kateniinin määrää ja sen fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä että (2) vähentävät niitä. (1) Länsimaisen dieetin suuri tyydyttyneiden rasvahappojen osuus kokonaisrasvasta ja kalsiumin pieni määrä voivat selittää lisääntyneitä β -kateniinin fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä ja β -kateniinin määrää. β -kateniinin fosforyloituminen seriini675-aminohappotähteestä on voinut lisätä β -kateniinin määrää, kun taas β -kateniinin fosforyloituminen seriini552-aminohappotähteestä on saattanut edistää β -kateniinin siirtymistä sytosolista tumaan. β -kateniini on todennäköisesti edistänyt suolistosyövän kehittymistä lisäämällä proto-onkogeenien kuten Akt:a koodaavien geenien ilmentymistä. (2) Toisaalta länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä on voinut muodostua insuliiniresistenssi, joka on voinut ehkäistä β -kateniinin fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä ja vähentää β -kateniinin määrää.

7. Yhteenveto

Pro gradu -tutkielman tavoitteena oli kokeilla ja kehittää edelleen fluoresenssiin pohjautuvaa Western blotting -menetelmää fosfo-Thr41/Ser45-, fosfo-Ser33/37/Thr41-, fosfo-Ser552-, fosfo-Ser675- ja fosfo-Tyr654- β -kateniinipitoisuuksien määrittämiseksi. Optimoinnissa hyödynnettiin Apc^{Min}-hiirinäytteitä ja ihmisen HT29- ja HCA7-paksusuolisyöpäsolujen näytteitä. Lopuksi menetelmää käytettiin fosfo-Ser552- ja fosfo-Ser675- β -kateniinipitoisuuksien määrittämiseen kasvistanolitutkimuksen ja ns. länsimainen dieetti -tutkimuksen Apc^{Min}-hiiriltä.

Fluoresenssiin perustuva menetelmä soveltuu paremmin β -kateniinin fosforylaatiomuotojen määrittämiseen kuin kemiluminesenssiin pohjautuva menetelmä, sillä fluoresenssiin perustuvalla menetelmällä voidaan analysoida samanaikaisesti β -kateniinin fosforylaatiomuotoa ja kokonais- β -kateniinia toisin kuin kemiluminesenssiin pohjautuvalla menetelmällä. Fluoresenssiin perustuva menetelmä saatiin toimimaan fosfo-Ser675- ja fosfo-Ser552- β -kateniinilla solu- ja hiirinäytteissä sekä fosfo-Ser33/37/Thr41- β -kateniinilla solunäytteissä. Olosuhteita ei saatu optimoitua fluoresenssiin pohjautuvalle menetelmälle soveltuvaksi analysoitaessa fosfo-Tyr654- ja fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniinia solu- ja hiirinäytteistä sekä fosfo-Ser33/37Thr41- β -kateniinia hiirinäytteistä. Vaikka fosfo-Thr41/Ser45- β -kateniini ei toiminut fluoresenssiin perustuvalla menetelmällä, siitä saatiin signaali kemiluminesenssiin pohjautuvalla menetelmällä.

Näyttää siltä, että kasvistanolidieetti sai aikaan solukalvon kolesterolitasapainon häiriintymisen, mikä on voinut lisätä β -kateniinin määrää ja sen fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä. Seriini675-aminohappotähteen fosforyloituminen ehkäisi todennäköisesti β -kateniinin hajottamista, mikä sai aikaan vapaan β -kateniinin määrän lisääntymisen sytosolissa. Seriini552-aminohappotähteen fosforyloituminen saattoi taas lisätä sytosolissa vapaana olevan β -kateniinin siirtymistä tumaan aktivoimaan geenien ilmentymistä. Nämä tapahtumat ovat voineet edistää suolistokasvaimien muodostumista kasvistanolidieettiä saaneilla hiirillä.

Länsimaista dieettiä saaneiden hiirien kiihtynyt suolistokasvaimien muodostuminen on näyttänyt olevan monimutkainen tapahtumasarja, johon on osallistunut Wnt-reitin ohella lukuisia energia-aineenvaihdunnan signaalireittejä. Länsimainen dieetti sisältää monia suolistosyövän riskitekijöitä kuten paljon rasvaa, etenkin tyydyttyynyttä rasvaa sekä vähän kalsiumia ja D₃-vitamiinia, jotka ovat saattaneet edistää suolistosyövän kehittymistä monella eri tavalla. Länsimaisen dieetin suuri tyydyttyneiden rasvahappojen määrä kokonaisrasvasta sekä kalsiumin pieni määrä ovat saattaneet edistää Wnt-reittiä lisäämällä β -kateniinin määrää ja sen fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä. β -kateniini on voinut edistää suolistokasvaimien kehittymistä lisäämällä proto-onkogeenien ilmentymistä. Toisaalta, länsimainen dieetti on myös voinut saada aikaan insuliiniresistenssin kehittymisen, joka on ehkäissyt β -kateniinin fosforyloitumista seriini552- ja seriini675-aminohappotähteistä ja vähentänyt β -kateniinin määrää. Tämä on voinut selittää sen, miksi β -kateniinia ja sen fosforylaatiomuotoja ei ollut tilastollisesti merkitsevästi enemmän länsimaista dieettiä saaneilla hiirillä verrattuna kontrollihiiriin.

Tutkimalla β -kateniinin fosforylaatiomuotoja saadaan yksityiskohtaisempaa tietoa β -kateniinin toiminnasta solussa kuin määrittämällä pelkästään kokonais- β -kateniinia, sillä β -kateniinin fosforylaation avulla säädellään sitä, minkä proteiinien kanssa β -kateniini kykenee vuorovaikuttamaan. β -kateniinin fosforylaatiomuotojen määritysmenetelmää tulisi optimoida ja kehittää edelleen, jotta saadaan syvällisempää ja yksityiskohtaisempaa tietoa ravinnon vaikutuksesta β -kateniinin toimintaan paksusuolisyövän solu ja -hiirimalleissa.

Kirjallisuusluettelo

Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, ym. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 2008;25:2097-116.

Arber N, Hibshoosh H, Moss SF, Sutter T, Zhang Y, Begg M, ym. Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* 1996;110:669-74.

Bahmanyar S, Guiney EL, Hatch EM, Nelson WJ, Barth AIM. Formation of extra centrosomal structures is dependent on β -catenin. *J Cell Sci* 2010;123:3125-35.

Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM, ym. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:1811-6.

Bek S, Kemler R. Protein kinase CKII regulates the interaction of β -catenin with α -catenin and its protein stability. *J Cell Sci* 2002;115:4743-53.

Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000;103:311-20.

Bose M, Hao X, Ju J, Husain A, Park S, Lambert JD, ym. Inhibition of tumorigenesis in *Apc*^{Min/+} mice by a combination of (-)-epigallocatechin-3-gallate and fish oil. *J Agric Food Chem* 2007;55:7695-700.

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Migrating cancer stem cells – an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005;5:744-9.

Brazil DP, Park J, Hemmings BA. PKB binding proteins: getting in on the Akt. *Cell* 2002;111:293-303.

Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between β -catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 2004;18:2225-30.

Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* 2002;156:817-28.

Carothers AM, Melstrom KA Jr, Mueller JD, Weyant MJ, Bertagnolli MM. Progressive changes in adherens junction structure during intestinal adenoma formation in *Apc* mutant mice. *J Biol Chem* 2001;276:39094-102.

Chakrabarty S, Radjendirane V, Appelman H, Varani J. Extracellular calcium and calcium sensing receptor function in human colon carcinomas: promotion of E-cadherin expression and suppression of β -catenin/TCF activation. *Cancer Res* 2003;63:67-71.

- Chakrabarty S, Wang H, Canaff L, Hendy GN, Appelman H, Varani J. Calcium sensing receptor in human colon carcinoma: interaction with Ca^{2+} and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 . *Cancer Res* 2005;65:493-8.
- Cho IR, Koh SS, Min H-J, Kim SJ, Lee Y, Park E-H, ym. Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF) enhances the expression of β -catenin, leading to a rapid proliferation of pancreatic cells. *Exp Mol Med* 2011;43:82-90.
- Civenni G, Holbro T, Hynes NE. Wnt1 and Wnt5a induce cyclin D1 expression through ErbB1 transactivation in HC11 mammary epithelial cells. *EMBO Rep* 2003;4:166-71.
- Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127:469-80.
- Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 2012;149:1192-205.
- Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12:364-71.
- Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of β -catenin adhesion and signaling functions. *Physiol* 2007;22:303-9.
- Dihlmann S, Kloor M, Fallsehr C, von Knebel Doeberitz M. Regulation of *AKT1* expression by beta-catenin/Tcf/Lef signaling in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2005;26:1503-12.
- Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. α -catenin is a molecular switch that binds E-cadherin- β -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 2005;123:903-15.
- Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, ym. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 2007;282:11221-9.
- Fang JY, Richardson BC. The MAPK signaling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005;6:322-7.
- Fini L, Piazzzi G, Ceccarelli C, Daoud Y, Belluzzi A, Munarini A, ym. Highly purified eicosapentaenoic acid as free fatty acids strongly suppresses polyps in $\text{Apc}^{\text{Min/+}}$ mice. *Clin Cancer Res* 2010;16:5703-11.
- Fodde R, Smits R, Clevers H. *APC*, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Rev Cancer* 2001;1:55-67.
- Fodde R, Brabletz T. Wnt/ β -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:150-8.
- Fujise T, Iwakiri R, Kakimoto T, Shiraishi R, Sakata Y, Wu B, ym. Long-term feeding of various fat diets modulates azoxymethane-induced colon carcinogenesis through Wnt/ β -catenin signaling in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G1150-6.

Galisteo ML, Chernoff J, Su Y-C, Skolnik EY, Schlessinger J. The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J Biol Chem* 1996;271:20997-1000.

Goentoro L, Kirschner MW. Evidence that fold-change, and not absolute level, of β -catenin dictates Wnt signaling. *Mol Cell* 2009;36:872-84.

Gottardi CJ, Peifer M. Terminal regions of β -catenin come into view. *Structure* 2008;16:336-8.

Harris ES, Nelson WJ. Adenomatous polyposis coli regulates endothelial cell migration independent of roles in β -catenin signaling and cell-cell adhesion. *Mol Biol Cell* 2010;21:2611-23.

Harris TJC, Peifer M. Decisions, decisions: β -catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends Cell Biol* 2005;15:234-7.

He XC, Yin T, Grindley JC, Tian Q, Sato T, Tao WA, ym. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet* 2007;39:189-98.

Heino J, Vuento M. 6. Genomin rakenne ja geenien ilmentymien. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. 1. painos. Porvoo: WSOY 2007a.

Heino J, Vuento M. 12. Solusykli ja solunjakautuminen. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. 1. painos. Porvoo: WSOY 2007b.

Herter P, Kuhnen C, Wittinghofer A, Müller O. Intracellular distribution of beta-catenin in colorectal adenomas, carcinomas and Peutz-Jeghers polyps. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:297-304.

Hino S-I, Tanji C, Nakayama KI, Kikuchi A. Phosphorylation of β -catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes β -catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol Cell Biol* 2005;25:9063-72.

Huang P, Senga T, Hamaguchi M. A novel role of phospho- β -catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene* 2007;26:4357-71.

Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. Three-Dimensional structure of the armadillo repeat region of β -catenin. *Cell* 1997;90: 871-82.

Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ, Weis WI. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of β -catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* 2001;276:12301-9.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 1.1 Introduction: Needs and prospects for cancer control. *World Cancer Report 2008*. WHO Press: World Health Organization; 2008a.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 5.7 Colorectal cancer. *World Cancer Report 2008*. WHO Press: World Health Organization; 2008b.

Janezic SA, Rao AV. Dose-dependent effects of dietary phytosterol on epithelial cell proliferation of the murine colon. *Food Chem Toxicol* 1992;30:611-6.

Jaszewski R, Millar B, Hatfield JS, Nogothu K, Finkenauer R, Rishi AK, ym. Folic acid reduces nuclear translocation of β -catenin in rectal mucosal crypts of patients with colorectal adenomas. *Cancer Lett* 2004;206:27-33.

Kaplan DD, Meigs TE, Kelly P, Casey PJ. Identification of a role for β -catenin in the establishment of a bipolar mitotic spindle. *J Biol Chem* 2004;279:10829-32.

Kim I-W, Myung S-J, Do MY, Ryu Y-M, Kim MJ, Do E-J, ym. Western-style diets induce macrophage infiltration and contribute to colitis-associated carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:1785-94.

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-70.

Knudsen KA, Wheelock MJ. Plakoglobin, or an 83-kD homologue distinct from β -catenin, interacts with E-cadherin and N-cadherin. *J Cell Biol* 1992;118:671-9.

Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-phenotype cells: Are they cousins or twins? *Cancers* 2011;3:716-29.

Koohestani N, Tran TT, Lee W, Wolever TMS, Bruce WR. Insulin resistance and promotion of aberrant crypt foci in the colons of rats on a high-fat diet. *Nutr Cancer* 1997;29:69-76.

Koohestani N, Chia MC, Pham NA, Tran TT, Minkin S, Wolever TM, ym. Aberrant crypt focus promotion and glucose intolerance: correlation in the rat across diets differing in fat, n-3 fatty acids and energy. *Carcinogenesis* 1998;19:1679-84.

Law MR. Plant sterol and stanol margarines and health. *West J Med* 2000;173:43-7.

Lee G, Goretsky T, Managlia E, Dirisina R, Singh AP, Brown JB, ym. Phosphoinositide 3-kinase signaling mediates β -catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis. *Gastroenterology* 2010;139:869-81.

Li Y, Shao Y, Tong Y, Shen T, Zhang J, Li Y, ym. Nucleo-cytoplasmic shuttling of PAK4 modulates β -catenin intracellular translocation and signaling. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:465-75.

Li-Cor Biosciences. Western blot analysis. Päivitetty 2011. Nettiviite: http://biosupport.licor.com/docs/Ody_Proto_09546.pdf. Viitattu 15.1.2013.

Li-Cor Biosciences. Good westerns gone bad: tips to make your NIR western blot great. Päivitetty 2012. Nettiviite: http://biosupport.licor.com/docs/Ody_Proto_09546.pdf. Viitattu 14.5.2013.

Liu C, Li Y, Semenow M, Han C, Baeg G-H, Tan Y, ym. Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108:837-47.

Luckert K, Götschel F, Sorger PK, Hecht A, Joos TO, Pötz O. Snapshots of protein dynamics and post-translational modifications in one experiment - β -catenin and its functions. *Mol Cell Proteomics* 2011;10:M110.007377.

Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:199-221.

MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009;17:9-26.

Maher MT, Mo R, Flozak AS, Peled ON, Gottardi CJ. β -catenin phosphorylated at serine 45 is spatially uncoupled from β -catenin phosphorylated in the GSK3 domain: implications for signaling. *PLoS One* 2010;5:E10184.

Marttinen M, Päivärinta E, Störvik M, Huikko L, Luoma-Halkola H, Piironen V, ym. Plant stanols induce intestinal tumor formation by up-regulating Wnt and EGFR signaling in ApcMin mice. *J Nutr Biochem* 2013;24:343-52.

Mathews ST, Plaisance EP, Kim T. Imaging systems for westerns: chemiluminescence vs. infrared detection. *Methods Mol Biol* 2009;536:499-513.

McCrea PD, Gu D. The catenin family at a glance. *J Cell Sci* 2010;123:637-42.

Medrek C, Landberg G, Andersson T, Leandersson K. Wnt-5a-CKI α signaling promotes β -catenin/E-cadherin complex formation and intercellular adhesion in human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 2009;284:10968-79.

Misikangas M, Pajari A-M, Päivärinta E, Mutanen M. Promotion of adenoma growth by dietary inulin is associated with increase in cyclin D1 and decrease in adhesion proteins in Min/+ mice mucosa. *J Nutr Biochem* 2005;16:402-9.

Miyabayashi T, Teo JL, Yamamoto M, McMillan M, Nguyen C, Kahn M. Wnt/ β -catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:5668-73.

Moore C. Introduction to Western Blotting. Nettiviite: <http://static.abdserotec.com/Lit-pdfs/Brochures1/westernblotbook.pdf>. Viitattu 15.1.13.

Mora MP, Tourne-Petel C, Charveron M, Fabre B, Milon A, Muller I. Optimisation of plant sterols incorporation in human keratinocyte plasma membrane and modulation of membrane fluidity. *Chem Phys Lipids* 1999;101:255-65.

Munemitsu S, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P. Deletion of an amino-terminal sequence β -catenin in vivo and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 1996;16:4088-94.

Newmark HL, Yang K, Lipkin M, Kopelovich L, Liu Y, Fan K, ym. A western-style diet induces benign and malignant neoplasms in the colon of normal C57B1/6 mice. *Carcinogenesis* 2001;22:1871-5.

Nordcan. Tärkeimpiä tilastotietoja lyhyesti. Suomi – Paksusuoli. Netiviite: <http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/StatsFact.asp?cancer=90&country=246>. Viitattu 17.1.2013.

Normén AL, Brants HAM, Voorrips LE, Andersson HA, van den Brandt PA, Goldbohm RA. Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am J Clin Nutr* 2001;74:141-8.

Olmeda D, Castel S, Vilaro S, Cano A. β -catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol Biol Cell* 2003;14:2844-60.

Pálmer HG, González-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, ym. Vitamin D₃ promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of β -catenin signaling. *J Cell Biol* 2001;154:369-87.

Park M-H, Kim D-J, You S-T, Lee C-S, Kim HK, Park SM, ym. Phosphorylation of β -catenin at serine 663 regulates its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;419:543-9.

Perry JK, Lins RJ, Lobie PE, Mitchell MD. Regulation of invasive growth: similar epigenetic mechanisms underpin tumour progression and implantation in human pregnancy. *Clin Sci* 2009;118:451-7.

Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K. A two step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* 2009;137:623-34.

Piedra J, Martinez D, Castaño J, Miravet S, Dunach M, Gracia de Herreros A. Regulation of β -catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 2001;276:20436-43.

Piedra J, Miravet S, Castaño J, Pálmer HG, Heisterkamp N, Gracia de Herreros A, ym. p120 catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate β -catenin Tyr-142 phosphorylation and β -catenin- α -catenin interaction. *Mol Cell Biol* 2003;23:2287-97.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837-51.

Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 2005;307:1904-9.

Raicht RF, Cohen BI, Fazzini EP, Sarwal AN, Takahashi M. Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res* 1980;40:403-5.

Randi G, Edefonti V, Ferraroni M, La Vecchia C, Decarli A. Dietary patterns and the risk of colorectal cancer and adenomas. *Nutr Rev* 2010;68:389-408.

Ratnayake WMN, L'Abbé MRL, Mueller R, Hayward S, Plouffe L, Hollywood R, ym. Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the lifespan of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 2000;130:1166-78.

Rey O, Chang W, Bikle D, Rozengurt N, Young SH, Rozengurt E. Negative cross-talk between calcium-sensing receptor and β -catenin signaling systems in colonic epithelium. *J Biol Chem* 2012;287:1158-67.

Reya T, Clevers H. Wnt signaling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843-50.

Ringerike T, Blystad FD, Levy FO, Madhus IH, Stang E. Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. *J Cell Sci* 2002;115:1331-40.

Risio M, Lipkin M, Newmark H, Yang K, Rossini FP, Steele VE, ym. Apoptosis, cell replication and western-style diet-induced tumorigenesis in mouse colon. *Cancer Res* 1996;56:4910-6.

Roura S, Miravet S, Piedra J, García de Herreros A, Duñach M. Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1999;274:36734-40.

Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulos A, ym. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3352-7.

Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT, ym. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2002;23:201-5.

Sadot E, Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Shnizer D, Lando Z, Zharhary D, ym. Regulation of S33/37 phosphorylated β -catenin in normal and transformed cells. *J Cell Sci* 2002;115:2771-80.

Sankila R, Pukkala E. Kolorektaalisyöpä. Nettiviite:
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=seh00014. Viitattu 17.1.2013.

Sipos F, Galamb O. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World J Gastroenterol* 2012;18:601-8.

Song DH, Sussman DJ, Seldin DC. Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:23790-7.

Song DH, Dominguez I, Mizuno J, Kaut M, Mohr SC, Seldin DC. CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of β -catenin potentiates Wnt signaling. *J Biol Chem* 2003;278:24018-25.

Staal FJT, van Noort M, Strous GJ, Clevers HC. Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated β -catenin. *EMBO Rep* 2002;3:63-8.

Su YY, Fu C, Ishikawa S, Stella A, Kojima M, Shitoh K, Schreiber EM, ym. APC is essential for targeting phosphorylated β -catenin to the SCF ^{β -TrCP} ubiquitin ligase. *Mol Cell* 2008;32:652-61.

Sun J. 4.4.4. Knockdown of the expression of PAK-1 blocks insulin stimulated c-Myc and cyclin D1 expression, and β -cat nuclear content. Väitöskirjassa: Crosstalk between insulin and Wnt signaling pathways. Toronton yliopisto; Toronto 2009:131, Nettiviite: https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/19299/1/Sun_Jane_200911_PhD_thesis.pdf.

Tang F-Y, Pai M-H, Chiang E-PI. Consumption of high-fat diet induces tumor progression and epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer in a mouse xenograft model. *J Nutr Biochem* 2012;23:1302-13.

Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D, Dulin NO. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2006;281:9971-6.

Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent β -catenin degradation. *J Cell Biol* 2003;162:899-908.

Umar S, Morris AP, Kourouma F, Sellin JH. Dietary pectin and calcium inhibit colonic proliferation *in vivo* by differing mechanisms. *Cell Prolif* 2003;36:361-75.

van der Flier, Clevers. Stem cells, self-renewal and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009;71:241-60.

van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, ym. The β -catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002;111:241-50.

Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 2010;12:468-76.

Vries RGJ, Huch M, Clevers H. Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol* 2010; 4:373-84.

World Cancer Research Fund (WCRF). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR 2007

World Cancer Research Fund International (WCRFI). Nettiviite: http://www.wcrf.org/cancer_statistics/data_specific_cancers/colorectal_cancer_statistics.php, viitattu 17.1.2013.

Wu H, Symes K, Seldin DC, Dominguez I. Threonine 393 of β -catenin regulates interaction with Axin. *J Cell Biochem* 2009;108:52-63.

Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, Williams DA, Long F. Rac1 activation controls nuclear localization of β -catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 2008;133:340-53.

Yang K, Edelmann W, Fan K, Lau K, Leung D, Newmark H, ym. Dietary modulation of carcinoma development in a mouse model for human familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1998;58:5713-7.

Yang K, Kurihara N, Fan K, Newmark H, Rigas B, Bancroft L, ym. Dietary induction of colonic tumors in a mouse model of sporadic colon cancer. *Cancer Res* 2008;68:7803-10.

Zeng G, Apte U, Micsenyi A, Bell A, Monga SPS. Tyrosine residues 654 and 670 in beta catenin are crucial in regulation of met- β -catenin interactions. *Exp Cell Res* 2006;312:3620-30.

Zhang T, Nanney LB, Luongo C, Lamps L, Heppner KJ, DuBois RN, ym. Concurrent overexpression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) in intestinal adenomas from multiple intestinal neoplasia (Min) mice and human familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1997;57:169-75.

Zhao J, Yue W, Zhu MJ, Sreejayan N, Du M. AMP-activated protein kinase (AMPK) cross-talks with canonical Wnt signaling via phosphorylation of β -catenin at Ser 552. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;395:146-51.

Zhu G, Wang Y, Huang B, Liang J, Ding Y, Xu A, ym. A Rac1/PAK1 cascade controls β -catenin activation in colon cancer cells. *Oncogene* 2012;31:1001-12.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:21-35.

Liitteet

LIITE 1. Liuosten, puskurien ja geelien ohjeet

SDS-Näytepuskuri (1:1)

0,5 M Tris-Hcl, pH 6,8	1,0 ml
Glyseroli	2,0 ml
10 % (W/V) SDS	1,6 ml
2-b-merkaptetaanoli	0,4 ml
0,1 % (W/V) bromofenolisininen	0,1 ml

1,5 M Tris-Hcl, pH 8,8 (250 ml)

Trizma-base	45,43 g
-------------	---------

Trizma-base liuotetaan milli-Q-veteen. pH säädetään 8,8:aan 1 M HCL-liuoksella. pH:n säätämisen jälkeen milli-Q-vettä lisätään niin paljon, että lopputilavuudeksi saadaan 250 ml.

0,5 M TrisHCL, pH 6,8 (200 ml)

Trizma-base	12,11 g
-------------	---------

Trizma-base liuotetaan milli-Q-veteen. pH säädetään 6,8:aan 1 M HCL-liuoksella. pH:n säätämisen jälkeen milli-Q-vettä lisätään niin paljon, että lopputilavuudeksi saadaan 200 ml.

10 % ammoniumpersulfaatti (APS, 100 ml)

APS	100 mg
Milli-Q-vesi	1 ml

10 % SDS-PAGE-alageeli (4 geeliä)

Milli-Q-vesi	5,5 ml
1,5 M Tris-Hcl, pH 8,8	3,4 ml
30 % akryyliamidi/ bis	4,5 ml
APS	66,7 µl
TEMED	6,7 µl

Alageeliä pipetoidaan 3,3 ml lasilevyjen väliin. Geelin kuivumisen estämiseksi ja tasaisen geelipinnan takaamiseksi alageelin päälle pipetoidaan milli-Q-vettä. Geelin annetaan jähmettyä 45 minuuttia.

10 % SDS-PAGE-ylägeeli (4 geeliä)

Milli-Q-vesi	4,1 ml
0,5 M Tris-Hcl, pH 6,8	1,7 ml
30 % akryyliamidi/ bis	0,9 ml
10 % APS	33 µl
TEMED	6,6 µl

Alageelin päällä oleva vesi poistetaan ja ylägeeliä pipetoidaan siten, että lasilevyjen välinen tila täyttyy geelillä. Lasilevyjen väliin asetetaan kampa, jotta geeliin muodostuu näytteiden pipetointia varten kaivot. Geelin annetaan jähmettyä tunnin.

Ajopuskuri SDS-PAGE, pH 8,5 (5-kertainen, 2 l)

Trizma-base	30 g
Glysiini	144 g
SDS	10 g

Kemikaalit liuotetaan milli-Q-veteen siten, että lopputilavuus on kaksi litraa. pH tarkistetaan, mutta sitä ei säädetä.

Blottauspuskuri SDS-PAGE, pH 8,1-8,4 (2 l)

Trizma-base	6,06 g
Glysiini	28,8 g
Metanoli	400 ml

Kemikaalit liuotetaan milli-Q-veteen siten, että lopputilavuus on kaksi litraa. pH tarkistetaan, mutta sitä ei säädetä.

TBS-puskuri, pH 7,4-7,6 (10-kertainen, 1 l)

Trizma-base	24,2 g
NaCl	80,0 g

Kemikaalit liuotetaan milli-Q-veteen. pH säädetään 7,4-7,6:een 1 M HCL-liuoksella. pH:n säätämisen jälkeen milli-Q-vettä lisätään niin paljon, että lopputilavuudeksi saadaan litra. Käytettäessä TBS-puskuria, laimennettuun liuokseen lisätään 0,1 % Tween 20 –detergenttiä.

LIITE 2. Työssä käytetyt reagenssit

Akryyliamidi/ Bis 30 %	Sigma, USA
APS	J.T. Baker, Hollanti
Bromofenolisininen	Sigma, USA
Glysiini	Riedel-de Haën, Saksa
Glyseroli	Riedel-de Haën, Saksa
HCL	Aldrich, USA
Milli-Q-vesi	Millipore, USA
Metanoli	Merck, Saksa
SDS	Fluka-Garantie, Saksa
SuperBlock T20 TBS	Thermo Scientific, USA
Trizma-base	Sigma, USA
TEMED	Yliopistoapteekki, Suomi
Tween 20	Sigma, USA
2-merkaptto-etanoli	Fluka-Garantie, Sveitsi